



Ludwig-Maximilians-Universität München

Department Biologie I

Bereich Genetik

---

Kälteschockregulation des  
Prozyklin Oberflächenproteins  
von *Trypanosoma brucei*

---

Martin Brenndörfer

Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
eingereicht am: 25. Februar 2010

**Erster Gutachter:**

**Prof. Dr. Michael Boshart**

Biozentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Bereich Genetik

**Zweiter Gutachter:**

**Prof. Dr. Martin Parniske**

Biozentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Bereich Genetik

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juli 2010

### **Ehrenwörtliche Versicherung**

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

München, den 25. Februar 2010



Martin Brenndörfer

### **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt wurde.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich mich anderweitig noch keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

München, den 25. Februar 2010



Martin Brenndörfer





## Zusammenfassung

Bedingt durch den Wechsel vom homoiothermen Säuger- zum poikilothermen Insektenwirt sind Trypanosomen unterschiedlichsten Umweltbedingungen ausgesetzt. Dies erfordert eine rasche Anpassung von Morphologie, Metabolismus und Oberflächenarchitektur des Parasiten. Im Blut weichen Trypanosomen durch periodischen Wechsel ihres dichten Mantels aus dem variablen Oberflächen-Glykoprotein (VSG) dem Immunsystem des Wirtes aus. Dichteabhängig wechseln einige Blutstromformen (BSF) irreversibel zu der im Zellzyklus arretierten- und für das Überleben in der Fliege prä-adaptierten stumpy Form. Mit der Differenzierung zum prozyklischen Fliegenstadium (PCF) ändert sich die Proteinzusammensetzung der Zelloberfläche extrem schnell von VSG zu den verschiedenen Prozyklin-Subtypen, den eine Funktion beim Tropismus des Parasiten durch die Fliege zugeschrieben wird. Die Verringerung der Inkubationstemperatur von 37 °C auf 27 °C und gleichzeitige Zugabe von Citrat oder *cis*-Aconitat in hohen Konzentrationen induziert *in vitro* die Differenzierung von *Trypanosoma brucei* BSF zu PCF. Das Absenken der Temperatur auf 20 °C (Kälteschock) ist allein ausreichend, um innerhalb weniger Stunden die Prozyklinexpression spezifisch bei BSF zu induzieren. Weiterhin wird durch Kälteschock die Sensitivität von stumpy Trypanosomen für Citrat und *cis*-Aconitat 1000-fach -und damit auf physiologische Konzentrationen- reduziert. Spätestens in der ersten Nacht nach Aufnahme des Parasiten beim Blutmahl der Tsetsefliege, sind die erforderlichen Temperaturunterschiede auch in den endemischen Gebieten Afrikas, südlich der Sahara festzustellen. In Trypanosomen wird die Genexpression fast ausschließlich posttranskriptionell reguliert. Für die stadienspezifische Regulation von Prozyklin sind verschiedene regulatorische *cis*-Elemente in der 3' untranslatierten Region (UTR) hauptverantwortlich. Für die Kälteschockinduktion von Prozyklin ist die 3'UTR nötig und hinreichend. Involvierte *trans*-Faktoren sind bislang nicht bekannt. Ein Sekundärstrukturmodell der 297 bp langen 3'UTR des *EP1* Prozyklins wurde experimentell validiert. Mutationen von an der stadienspezifischen Regulation beteiligten 3'UTR-Elementen, sowie weitere, systematische und strukturkonservative 3'UTR-Mutationen sollen Sequenzen aufzeigen, die an der Kälteschockinduktion beteiligt sind. Effekte durch differenzielle 3'-Prozessierung der mRNA wurden ausgeschlossen. Hinweise für temperaturabhängige Veränderungen der Sekundärstruktur, ähnlich den bei Bakterien beschriebenen RNA-Thermometern, wurden nicht gefunden.

Mutationen einzelner Abschnitte oder sogar größere Deletionen der ersten- bzw. zweiten Hälfte der *EP1* 3'UTR haben nur geringe Auswirkungen auf die Induzierbarkeit durch Kälteschock. Mit Loop IV konnte ein neues regulatorisches Element in den kälteschockinduzierbaren 3'UTRs der *EP1* und *GPEET* Prozykline identifiziert werden. Loop IV beeinflusst auch die stadienabhängige Expression von Prozyklin. Mit Hilfe von systematischen Kombinationen verschiedener 3'UTR-Mutationen wurden komplexe Zusammenhänge zwischen verschiedenen *cis*-Elementen gezeigt. Bestimmte 3'UTR-Sequenzen wirken redundant. So verringert erst die parallele Deletion von Loop II und

Loop IV der *EP1* 3'UTR (gleichzeitige Mutation von drei negativen Elementen) die Induzierbarkeit durch Kälteschock auf ein Minimum. Der verbleibende Effekt entspricht dem unterschiedlicher Kontroll-3'UTRs [Aldolase (trunkiert), Aktin, Tubulin]. Es wurden ferner stadienspezifische Unterschiede beim Zusammenwirken verschiedener regulatorischer *cis*-Elemente identifiziert.

Zusätzlich sollten in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Christine Clayton und Jörg Hoheisel (ZMBH bzw. DKFZ Heidelberg) mit Hilfe von DNA-Microarrays genomweit Expressionsänderungen nach Kälteschock, sowie nach Induktion mit dem Phosphodiesterase (PDE) Inhibitor Dipyridamol analysiert- und coregulierte Sequenzen identifiziert werden. Der Vergleich dieser Stimuli diene der Unterscheidung von kälteschockspezifischen und generell durch Stress induzierten Veränderungen. Aufgrund der Vielzahl der nach Kälteschock differenziell regulierten Gene und der im Laufe dieser Arbeit festgestellten Komplexität der Prozyklin Regulation über die 3'UTR, erschien die geplante Identifikation von Konsensuselementen durch Sequenzvergleich mit der Prozyklin 3'UTR wenig aussichtsreich und wurde nicht fortgeführt.

Die Beteiligung verschiedener Kandidatenproteine als *trans*-Faktor bei der kälteschockabhängigen Regulation von Prozyklin wurde ebenfalls untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der Prozess sowohl von der ebenfalls durch Kälteschock induzierbaren Proteinkinase-A (PKA) ähnlichen Kinase-, als auch von dem an die Prozyklin 3'UTR-bindenden Zinkfinger Protein (ZFP) 3 unabhängig ist. Eine Beteiligung der zelleigenen Maschinerie für RNA-Interferenz (RNAi) am Regulationsprozess wurde durch Nullmutation des für RNAi essenziellen Argonaute (*ago*) 1 Gens experimentell ausgeschlossen. Für die, in der *EP1* 3'UTR gefundenen Sequenz mit hoher Homologie zum Konsensuselement der Bindestelle für Cold Shock Domain (CSD) -Proteine, sowie für die drei im Genom von *T. brucei* identifizierten Kandidatenproteine mit CSD-Domäne, wurde keine Beteiligung an der Kälteschockinduktion von Prozyklin festgestellt.

Die Signalkaskaden des evolutionär früh von der eukaryontischen Hauptlinie abgespaltenen Protozoen *T. brucei* sind weitestgehend unbekannt. Gene für die in Eukaryonten verbreiteten G-Protein-gekoppelten 7-Transmembran Rezeptoren fehlen im Genom ebenso, wie solche für Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die Signalübertragung muss demzufolge über alternative Wege erfolgen. Um Komponenten der Signalwege nach Kälteschockinduktion, sowie der Differenzierung von BSF zu PCF in einem Top-down Ansatz identifizieren zu können, wurde eine Methode etabliert, mit der Veränderungen der Proteinphosphorylierungen sowohl bei slender-, als auch bei stumpy Trypanosomen durch radioaktive Markierung nachgewiesen werden können. Durch den Vergleich von WT BSF und Zellen mit Nullmutation der regulatorischen Untereinheit der PKA-ähnlichen Kinase wurde die Methode exemplarisch validiert. Sie erlaubt nun durch Vergleich verschiedener Zelllinien (slender, stumpy, Nullmutante), nach diversen Stimuli (Kälteschock, Citrat/*cis*-Aconitat, Induktion von RNAi, ...) und Kombinationen davon, möglicherweise die Identifikation neuartiger Proteinkomponenten dieser zentralen Signalwege.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Phylogenetische Einordnung von <i>Trypanosoma brucei</i>	1
1.2	Afrikanische Trypanosomiasis	2
1.3	Lebenszyklus von <i>T. brucei</i>	3
1.4	Oberflächenmoleküle von <i>T. brucei</i>	5
1.4.1	Variables Oberflächen-Glykoprotein	5
1.4.2	Prozykline	6
1.4.3	<i>Brucei</i> Alanin-reiche Proteine	8
1.5	Besonderheiten der Genexpression	9
1.6	<i>In vitro</i> -Differenzierung und Kälteschock	11
1.7	Regulatorische <i>cis</i> -Elemente der Prozyklin 3'UTRs	13
1.7.1	Positives Element in Loop I (nt 1-40)	14
1.7.2	26mer: negatives Element in Loop II (nt 134-159)	14
1.7.3	Negatives Element in Loop III	15
1.7.4	16mer: positives Element in Loop III (nt 204-219)	15
1.7.5	Glyzerin-abhängiges Element der <i>GPEET</i> 3'UTR (nt 160-184)	15
1.8	Kandidaten für <i>trans</i> -Faktoren der Kälteschockregulation	16
1.8.1	Endogene RNAi-Maschinerie	16
1.8.2	PKA-ähnliche Kinase	16
1.8.3	Zinkfinger Protein 3	17
1.8.4	Proteine mit Cold Shock Domäne	18
1.9	Genomweite Analyse der Genexpression	18
1.10	Analyse des Phosphoproteoms nach Differenzierungsreizen	19
2	Material und Methoden	
2.1	Material	21
2.1.1	<i>Escherichia coli</i>	21
2.1.2	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	21
2.1.2.1	Wildtyp Stämme	21
2.1.2.2	Transgene Stämme	21
2.1.3	Antikörper	27
2.1.4	Plasmide	27

2.1.5	Oligonukleotide	33
2.1.5.1	Primer für Sequenzierungen	33
2.1.5.2	Primer für reverse Transkription und RACE PCR	34
2.1.5.3	Primer und Hydrolysesonden für quantitative Real Time PCR	34
2.1.5.4	Primer für Klonierungen	35
2.1.6	Enzyme	36
2.1.7	Antibiotika	37
2.1.8	Chemikalien	37
2.1.9	Medien und Puffer	38
2.1.10	Kits	40
2.1.11	Geräte	41
2.1.12	Internetdienste	42
2.1.13	Software	42
2.1.14	Sonstige Materialien	43
2.2	Methoden und Protokolle	43
2.2.1	Zellkultur von <i>Trypanosoma brucei</i>	43
2.2.1.1	Kultur von monomorphen BSF	43
2.2.1.2	Kultur von PCF	43
2.2.1.3	Kälteschockinduktion	44
2.2.1.4	Kryolagerung	44
2.2.1.5	Stabile Transfektion monomorpher BSF	44
2.2.1.6	Stabile Transfektion von PCF	45
2.2.1.7	RNA-Interferenz	45
2.2.1.8	Metabolische Markierung mit $^{32}\text{P}$	45
2.2.2	<i>Escherichia coli</i> Methoden	46
2.2.2.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien	46
2.2.2.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	46
2.2.2.3	Elektroporation	46
2.2.2.4	Chemische Transformation	47
2.2.2.5	Langzeitlagerung	47
2.2.2.6	Isolierung von Plasmid DNA	47
2.2.3	Standard Kloniertechniken	47
2.2.3.1	Enzymatische Behandlung von DNA	47
2.2.3.2	DNA-Amplifikation (PCR)	47
2.2.3.3	Agarosegel-Elektrophorese von DNA	47
2.2.3.4	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	47

2.2.3.5	Präzipitation von Nukleinsäuren	48
2.2.3.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
2.2.3.7	Sequenzierung von DNA	48
2.2.4	Isolierung von Nukleinsäuren aus <i>T. brucei</i>	48
2.2.4.1	Isolierung von genomischer DNA	48
2.2.4.2	Isolierung von Gesamt-RNA	49
2.2.4.3	Isolierung von polysomenassoziiierter RNA	49
2.2.5	Vertikale Glyoxalgelelektrophorese von RNA	50
2.2.6	Ethidiumbromidfärbung von RNA im Glyoxalgele	50
2.2.7	Northern Blot	50
2.2.7.1	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	50
2.2.7.2	Polyethylenimin Chromatographie	50
2.2.7.3	Hybridisierung	51
2.2.8	Quantitative Real Time PCR	51
2.2.8.1	Reverse Transkription für Real Time PCR	51
2.2.8.2	Real Time PCR mit SYBR Green	51
2.2.8.3	Real Time PCR mit Hydrolysesonden	52
2.2.9	Microarrays	53
2.2.9.1	Microarrayanalyse kälteschockinduzierter BSF	53
2.2.9.2	Microarrayanalyse nach Inkubation mit Dipyridamol	54
2.2.10	Bestimmung von Transkriptgrößen durch 3'RACE PCR	54
2.2.11	Sekundärstrukturen von Prozyklin 3'UTR-Mutanten	54
2.2.12	HMMER Profilsuchen	55
2.2.12.1	Suche nach weiteren Proteinen der ZFP-Familie	55
2.2.12.2	Suche nach Proteinen mit Cold Shock Domäne	55
2.2.13	Konzentrationsbestimmung von Gesamtprotein	55
2.2.14	Luciferase Reporterassay	55
2.2.15	SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese	56
2.2.16	Zweidimensionale Gelelektrophorese	56
2.2.17	Western Blot	56
2.2.18	Silberfärbung	57
2.2.19	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	57

## 3 Ergebnisse

3.1 Experimentelle Strategie	59
3.2 Eingrenzung von <i>cis</i> -Elementen für Kälteschockregulation	59
3.2.1 Wahl des Reportergens	59
3.2.2 Verschiedene Luciferase Reportergene	61
3.2.3 Optimierung des Luciferase-Assays	62
3.2.4 Normierung der Luciferaseexpression	63
3.2.5 Identifikation eines Referenzgens für die Real Time PCR	63
3.2.6 Einfluss des Reporters auf die Regulation	68
3.2.7 Induzierbarkeit durch Kälteschock ist stadienspezifisch	69
3.2.8 Kälteschockinduktion durch <i>GPEET</i> 3'UTR	70
3.2.9 Generelle Induktion nach Kälteschock	71
3.2.10 Strategie der Mutationsanalyse	72
3.2.10.1 Prozessierung mutierter 3'UTRs	74
3.2.10.2 Sekundärstrukturen mutierter 3'UTRs	75
3.2.11 Effekte der 3'UTR-Mutationen auf die Genexpression	77
3.2.11.1 Linearität des Real Time PCR-Assays	77
3.2.11.2 Biologische Variation des Real Time PCR-Assays	77
3.2.11.3 Kälteschockinduktion stellt einen Teil der Stadienregulation dar	78
3.2.11.4 Kälteschockregulation über mehr als ein 3'UTR-Element	79
3.2.11.5 Homologie zu CSD-Protein Bindemotiv in der <i>EP1</i> 3'UTR	79
3.2.11.6 Strukturkonservative Sequenzveränderungen zerstören das 16mer	81
3.2.11.7 Das 16mer ist nur in BSF unabhängig vom 26mer	82
3.2.11.8 Loop IV: ein neues regulatorisches <i>cis</i> -Element	83
3.2.11.9 Stadienspezifische Interaktionen von Loop II und Loop IV	84
3.2.11.10 Minimale Kälteschockinduktion in $\Delta$ LII+IV Mutante	85
3.2.11.11 Stadienspezifisch kooperative Effekte der positiven Elemente	86
3.3 Genomweite Genexpressionsanalyse	88
3.3.1 Microarrayanalyse kälteschockinduzierter BSF	88
3.3.1.1 Genexpression nach Kälteschock	89
3.3.1.2 Microarrays mit polysomenassoziiierter RNA	93
3.3.1.3 Kälteschock- und stadienspezifische Regulation	93
3.3.2 Microarrayanalyse nach Inkubation mit Dipyrindamol	94
3.3.2.1 Genexpression nach Zugabe von Dipyrindamol	95
3.3.2.2 Schnittmenge der durch Kälte und Dipyrindamol differenziell regulierten Gene	97

3.4	Beteiligung möglicher <i>trans</i> -Faktoren an der Kälteschockregulation von Prozyklin	98
3.4.1	Regulation durch die endogene RNAi-Maschinerie?	98
3.4.2	Kälteschockinduktion ist unabhängig von der PKA-ähnlichen Kinase	98
3.4.3	Kälteschockinduktion ist unabhängig von ZFP3	99
3.4.4	RNAi gegen CSD-Proteine hat keinen Effekt auf die Kälteschockinduktion	102
3.5	Analyse des Phosphoproteoms	104
3.5.1	<i>In vivo</i> -Markierung von Trypanosomen mit <sup>32</sup> P	104
3.5.1.1	Phosphatdepletion	105
3.5.1.2	Zeitverlauf des Einbaus	105
3.5.1.3	Menge an <sup>32</sup> P	106
3.5.1.4	Zelldichte in Markierungsreaktion	107
3.5.1.5	Markierung von stumpy BSF	107
3.5.2	Differenzielle Phosphorylierungen der <i>pkar</i> Nullmutante	108
3.5.3	Differenzielle Phosphorylierungen nach kurzzeitiger Kälteschockinduktion	110
4	Diskussion	
4.1	Kälteschockregulation über die <i>EP1</i> 3'UTR	111
4.2	Stadienregulation über die <i>EP1</i> 3'UTR	113
4.3	Globaler Ansatz zur Kälteschockregulation	115
4.4	<i>Trans</i> -Faktoren der Kälteschockregulation?	117
4.5	Identifikation potentieller Signalproteine	119
5	Literaturverzeichnis	
5.1	Bücher	123
5.2	Artikel	123
6	Anhang	
6.1	Abkürzungsverzeichnis	139
6.2	mRNA- und Protein Daten	141
6.3	Replikatmessungen der mRNA-Expressionen	142
6.4	Parameter für die Berechnung von 3'UTR-Sekundärstrukturen	143
6.5	Formeln für statistische Berechnungen	143
6.6	Zusammensetzung phosphatfreies HMI9	144
6.7	Elektronischer Anhang auf beiliegender DVD	146

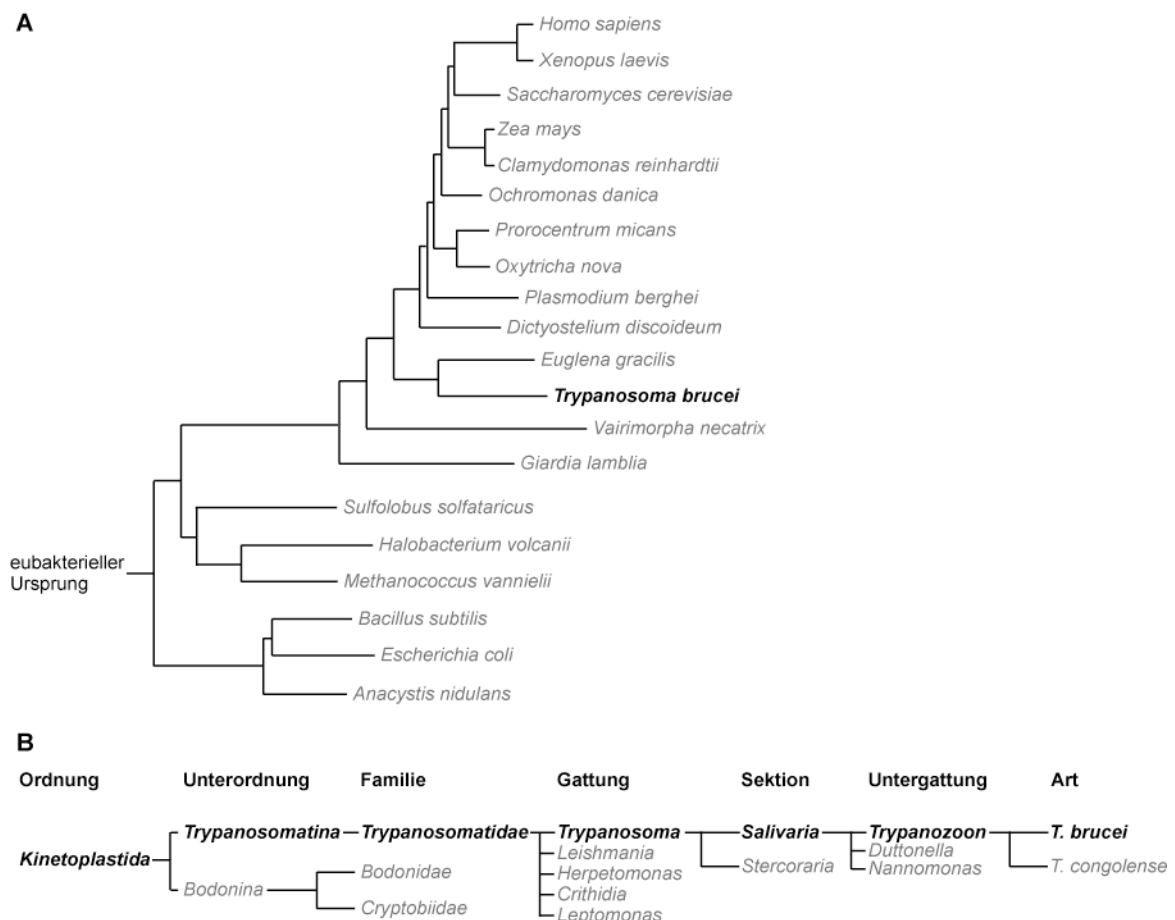




# 1 Einleitung

## 1.1 Phylogenetische Einordnung von *Trypanosoma brucei*

Trypanosomen sind gestreckte, spindelförmige Hemoflagellaten aus der Ordnung Kinetoplastida (siehe Abb. 1). Diese hat sich bereits früh in der eukaryontischen Evolution von der Linie der Opisthokonta abgespalten (Rodriguez-Ezpeleta et al. 2007). Einige zellbiologische Besonderheiten wurden in diesen Organismen erstmals identifiziert, bevor sie zum Teil später auch in anderen Organismen gefunden werden konnten [Glycosylphosphatidylinositol (GPI) -Anker (Ferguson 1999), *trans*-Spleißen (Liang et al. 2003), RNA-Editierung (Simpson et al. 2003), antigene Variation (Pays 2005)]. Namensgebend ist der nahe dem Basalkörper des Flagellums lokalisierte Kinetoplast, in dem die hochorganisierte DNA des singulären Mitochondriums konzentriert ist. Je nach Anzahl der Flagellen erfolgt die Einteilung in die Unterordnungen Bodonina (zwei Flagellen) und Trypanosomatina (ein Flagellum). Zur Letzteren gehört auch die Familie der parasitierenden Trypanosomatidae, die unter anderem die Gattung *Trypanosoma* einschließt. Diese wird je nach Vermehrungsort im Vektor und der Art der Übertragung in die Sektionen Stercoraria und Salivaria aufgeteilt. Erstere vermehren sich im posterioren Teil des Darms und werden durch Fäzes übertragen. Zu ihnen gehört *T. cruzi*, der Erreger der in Mittel- und Südamerika verbreiteten- und durch Raubwanzen übertragenen Chagas-Krankheit.



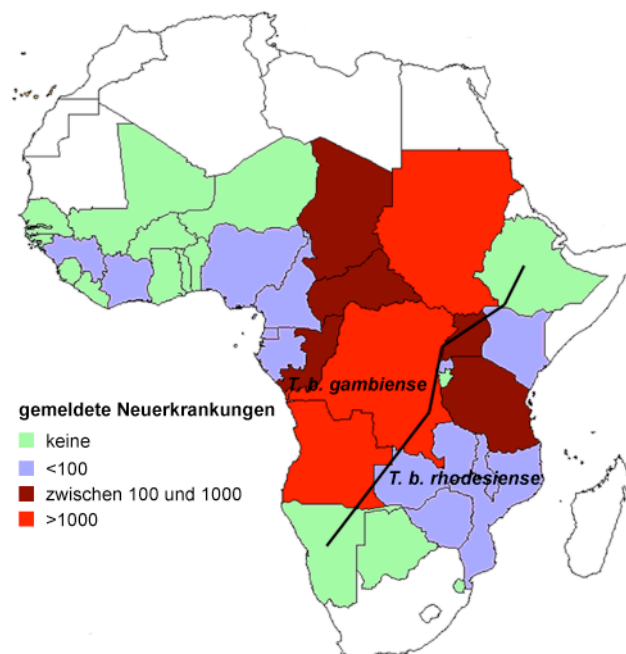
**Abb. 1: Phylogenetische Einordnung des Protozoen *Trypanosoma brucei***

(A) Sequenzvergleich der 16S rRNAs nach Sogin et al. (1989). (B) Systematische Einteilung nach Clayton (1988).

Salivaria vermehren sich im anterioren Teil des Verdauungstraktes des Vektors und werden durch Speichel übertragen. Zu ihnen rechnet man die Untergattung Trypanozoon, die aufgrund von Unterschieden in Morphologie, Pathologie und Wirtsspektrum weiter in die Arten *T. brucei* und *T. congolense* untergliedert wird. Die in weiten Teilen Afrikas (dem so genannten Tsetse-Gürtel) heimische Tsetsefliege (*Glossina* Spezies) ist der Überträger von *T. brucei*. Der Erreger der afrikanischen Rinderseuche (Nagana) (*T. b. brucei*), sowie die beiden Erreger der afrikanischen Trypanosomiasis beim Menschen (*T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense*) sind biochemisch nur schwer zu unterscheidende Unterarten (Agbo et al. 2003). In der Grundlagenforschung dient deshalb der nicht humanpathogene Stamm als Modellsystem.

## 1.2 Afrikanische Trypanosomiasis

Die von Trypanosomen übertragene afrikanische Trypanosomiasis oder auch Schlafkrankheit ist in 36 südlich der Sahara gelegenen Ländern Afrikas endemisch. 22 dieser Länder gehören zu den Ärmsten der Erde. Sie stellt für über 50 der 400 Millionen Einwohner ein Risiko dar. Geschätzte elf Millionen Menschen sind infiziert (Wilkinson und Kelly 2009). Nur ein kleiner Teil der betroffenen Bevölkerung hat Zugang zu medizinischer Versorgung. In Abb. 2 ist die geographische Verteilung der zwischen 2000 und 2007 an die Weltgesundheitsorganisation (WHO) gemeldeten Fälle von Schlafkrankheit dargestellt. Schätzungen gehen von bis zu 70000 neu infizierten Personen pro Jahr aus (WHO 2006).



**Abb. 2: Geographische Verteilung von Neuerkrankungen**

Anzahl der in den Jahren 2000 bis 2007 jährlich an die WHO gemeldeten Neuerkrankungen mit der Schlafkrankheit in verschiedenen Ländern Afrikas nach Simarro et al. (2008).

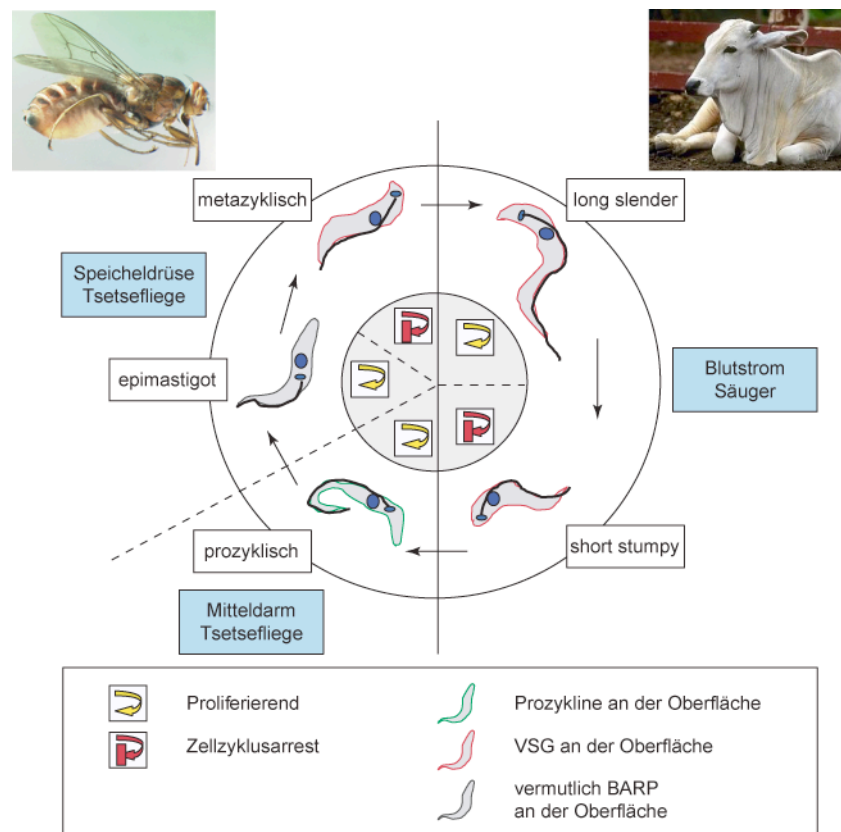
Die Infektion mit dem Erreger beginnt mit der Übertragung durch eine infizierte Tsetsefliege und dem Eindringen in das Bindegewebe des Wirtes. Die Trypanosomen vermehren sich im Folgenden im Blut und im lymphatischen System des Säugerwirtes. Dieses Stadium der Erkrankung kann durch eine charakteristische Schwellung an den zervikalen Lymphknoten gekennzeichnet sein und über

mehrere Jahre andauern. Fieber, Gelenk- und Kopfschmerzen, Ödeme sowie Durchfall sind weitere typische Symptome. Die zweite Phase der Erkrankung beginnt, sobald Parasiten die Blut-Hirn-Schranke überwinden und ins Zentralnervensystem eindringen, wo sie eine schleichende chronische Enzephalopathie hervorrufen. Die Erreger sind im Liquor des Patienten nachweisbar. Die Symptome dieses zweiten Stadiums sind starke Kopfschmerzen, langsame Wesensveränderungen, Verwirrtheit, schließlich Apathie, Somnolenz bis hin zum Koma. Unbehandelt führt die Krankheit zum Tod. Ein Impfstoff wurde bislang nicht gefunden. Therapien sind nur bei rechtzeitiger Diagnose Erfolg versprechend, denn nach Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ist die medikamentöse Behandlung nur bedingt möglich. Entsprechende Arzneimittel sind zudem für weite Teile der Bevölkerung in den betroffenen Gebieten unerschwinglich, schwer zu verabreichen und haben zum Teil dramatische Nebenwirkungen bis hin zum Tode des Patienten [zusammengefasst von Brun et al. (2009)].

### 1.3 Lebenszyklus von *T. brucei*

Trypanosomen sind Endoparasiten mit einem komplexen Lebenszyklus, der extrazelluläre Stadien in Säugetieren und Insekten umfasst (siehe Abb. 3). Es gibt Hinweise darauf, dass alle bisher bekannten 31 Spezies der Tsetsefliege Trypanosomen übertragen können, allerdings mit unterschiedlicher Effizienz (Aksoy et al. 2003). Die Infektion des Säugers beginnt mit der Übertragung von bis zu 20000 metazyklischen, im Zellzyklus arretierten Parasiten durch die Tsetsefliege. Nach Wiedereintritt in den Zellzyklus wird die 25-40 µm lange, trypomastigote slender Form (siehe auch Abb. 4) gebildet, die sich zunächst in den interstitiellen Gewebespalten und später im Blut durch ungeschlechtliche Teilung vermehrt. Die Zelloberfläche der BSF ist vollständig vom VSG-Protein bedeckt. Durch ständige Variation der antigenen Oberflächenstruktur kann eine Erkennung durch das Immunsystem des Säugerwirts umgangen werden (siehe 1.4.1). Zur Energiegewinnung verstoffwechseln BSF in spezialisierten Organellen (Glykosomen) die im Blut reichlich vorhandene Glukose über die Glykolyse zu Pyruvat (90 %) und Glycerin (10%). Das Mitochondrium ist in BSF nur rudimentär entwickelt (Bringaud et al. 2006).

Wenn die Parasitämie eine bestimmte Dichte überschreitet, verändern sich einige Trypanosomen irreversibel zu der im Zellzyklus arretierten stumpy Form (15-20 µm). Ein kleiner (<500 Da), von den Parasiten ausgeschütteter und bisher nicht genauer charakterisierter „stumpy induction“ Faktor (SIF) induziert diesen Wechsel (Reuner et al. 1997; Vassella et al. 1997). Die strikte Wachstumskontrolle der Parasitenpopulation ist eine wichtige Voraussetzung für Langzeit-Persistenz von Trypanosomen in ihrem Säugerwirt. Stumpy Trypanosomen sind bereits für das Leben in der Fliege prä-adaptiert und entwickeln sich nach Aufnahme durch die Tsetsefliege in deren Mitteldarm weiter zu PCF.

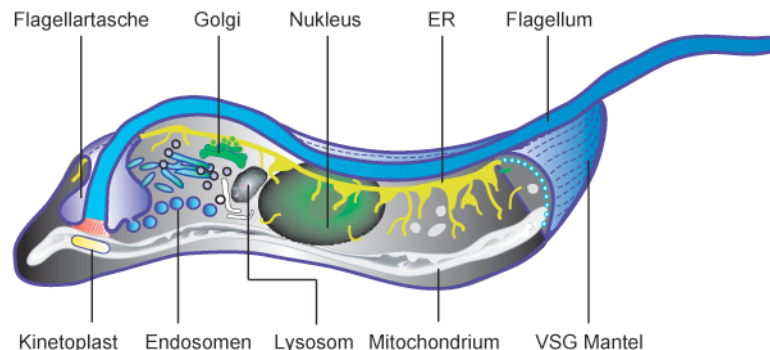


**Abb. 3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *T. brucei***

Modifiziert nach Vorlage von McKean (2003). VSG: variables Oberflächen-Glykoprotein; BARP: *Brucei* Alanin-reiches Protein.

Durch die mit dem Wechsel vom homoiothermen Säugerwirt zum poikilothermen Insektenvektor einhergehenden Veränderungen der Umweltbedingungen ist der Parasit darauf angewiesen, sich durch morphologische und metabolische Veränderungen der Zelle (Vickerman 1985; Vickerman et al. 1988) an die verschiedenen Lebensräume anzupassen. Der VSG-Mantel wird rasch durch einen Oberflächenmantel aus Prozyklinmolekülen ersetzt. Der Metabolismus wird umgestellt und ATP vor allem über die oxidative Phosphorylierung im Mitochondrium synthetisiert, das in diesem Stadium voll funktionell ist. Als Energiequelle dient hauptsächlich Prolin (Bringaud et al. 2006). Die genaue Kontrolle des Zellzyklus sowie der Differenzierung, sind wichtige Voraussetzungen für das Durchlaufen des Lebenszyklus. Microarrayanalysen belegen, dass beim Vergleich von BSF mit PCF nur etwa 2% der detektierbaren Transkripte differenziell reguliert sind (Diehl et al. 2002; Brems et al. 2005). Bei einer Gegenüberstellung der Proteine von BSF und PCF nach 2D Gelelektrophorese wurden ebenfalls nur geringe Unterschiede festgestellt (van Deursen et al. 2003). Die verwendete Methode, erlaubt allerdings nur die Untersuchung abundanter, löslicher Proteine. Nachdem die Parasiten die Speicheldrüsen der Fliege erreicht haben, entwickeln sie sich zur epimastigoten Form. Experimente mit fluoreszenzmarkierten Trypanosomen zeigten, dass es hier zum Austausch von genetischer Information zwischen verschiedenen Zellen kommen kann (Gibson et al. 2008), was die genetische Diversität dieses Organismus, für den kein obligater sexueller Zyklus bekannt ist, erhöht. Schließlich reifen die Trypanosomen zur metazyklischen Form, die (wie die stumpy Form) in der  $G_0/G_1$ -Phase des Zellzyklus arretiert ist.

Durch die Expression des VSG-Mantels auf ihrer Zelloberfläche (Tetley et al. 1987) sind sie auf das Überleben nach dem Wirtswechsel vorbereitet und damit für Säugetiere das infektiöse Stadium. Der Zyklus in der Fliege dauert je nach Wirtsspezies und Umgebungstemperatur 20-30 Tage (Aksoy et al. 2003). Ein infizierter Vektor bleibt bis zu seinem Tod infektiös.

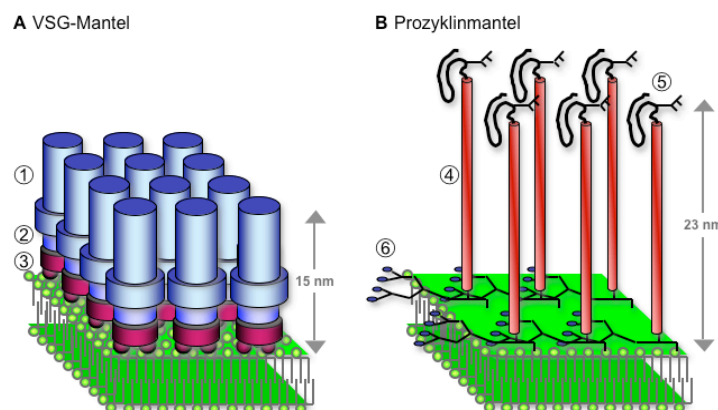


**Abb. 4: Zellulärer Aufbau von *T. brucei* BSF**

Nach Vorlage von Overath und Engstler (2004). Kennzeichnend sind die polare Morphologie, sowie die singulären Organellen. ER: endoplasmatisches Retikulum.

## 1.4 Oberflächenmoleküle von *T. brucei*

Es wird davon ausgegangen, dass die Oberfläche aller Lebensstadien von *T. brucei* von jeweils nur einer Art von Proteinen umgeben ist, die über GPI-Anker an die Plasmamembran gebunden sind.



**Abb. 5: Schematisierte Darstellung der Oberflächenproteine von *T. brucei***

Modifiziert von Markus Engstler, nach Mehlert et al. (1998). (A) VSG: ① N-Terminus, ② C-Terminus, ③ GPI-Anker; (B) Prozyklin: ④ repetitive (E-P bzw. G-P-E-E-T) Aminosäure-Sequenz, ⑤ N-Glykan (nur bei EP1 und EP3 Prozyklinen), ⑥ GPI-Anker mit verzweigten Poly-*N*-Acetyllactosamin Seitenketten.

### 1.4.1 Variables Oberflächen-Glykoprotein

Blutstrom- und metazyklische Formen, die dem Immunsystem des Säugerwirtes ausgesetzt sind, besitzen an ihrer Oberfläche einen homogenen, 12-15 nm dicken Mantel aus ca.  $5 \times 10^6$  N-glykosylierten VSG Homo-Dimeren [siehe Abb. 5 (A)]. Nach Schätzungen entspricht das bis zu 10% des Gesamtproteins der Zelle (Hotz et al. 1998). Weitere (invariante) Oberflächenproteine wie etwa Rezeptoren oder Transporter sind innerhalb dieser makromolekularen Strukturen verborgen. In PCF ist das VSG-Protein nicht detektierbar. Sequenzen in der VSG 3'UTR (8mer und 14mer) sind an der stadienspezifischen Regulation der VSG-Expression beteiligt. Sie beeinflussen sowohl die mRNA-Abundanz als auch deren Translation (Berberof et al. 1995). Im Genom von *T. brucei* wird ein Repertoire aus 1250-1500 verschiedenen VSG-Genen und vor allem -Pseudogenen vermutet.

Die genaue Zahl ist unklar, da im Rahmen des *T. brucei* Genomprojektes<sup>1</sup> bislang nur die Sequenzierung der elf Megabasen-Chromosomen abgeschlossen wurde, die etwa 80-90% des nukleären Genoms darstellen. Die Sequenzierung der Chromosomen mittlerer Größe (ca. 350 kb), sowie der etwa 100 Mini-Chromosomen (30-150 kb), an deren Telomeren ebenfalls VSG- (Pseudo-) Gene lokalisiert sind, ist unvollständig.

BSF transkribieren permanent von einer der etwa 20 Telomer-nahen Expressionsstellen (ES) aus, nur ein VSG-Gen (monoallelische Expression). Durch permanente Endozytose der homogenen VSG-Proteinoberfläche wird die komplementaktivierte Lyse der Plasmamembran verhindert. Zusätzlich werden durch die entgegen der Bewegungsrichtung auftretenden Strömungskräfte an das VSG gebundene Antikörper passiv zum posterioren Ende (in Abb. 4 links) der Zelle bewegt. Über die flagellare Tasche werden diese dort endozytiert und im Zellinneren abgebaut (Engstler et al. 2007). Als weiteren Schutzmechanismus wechseln die Parasiten außerdem periodisch ihre Oberflächenepitope (antigene Variation), um der humoralen Immunantwort zu entgehen (Pays 2005). Die heranwachsende Trypanosomenpopulation wird vom Immunsystem des Säugerwirtes zunächst nicht erkannt. Erst nach einiger Zeit führen spezifische, antikörpervermittelte Immunreaktionen zur Eliminierung dieser Population. In der Zwischenzeit kann sich jedoch eine andere Subpopulation bilden, die ein antigenetisch unterschiedliches VSG-Protein exprimiert, dessen Epitope dem Immunsystem unbekannt sind. Die für Infektionen mit Trypanosomen charakteristischen, wiederkehrenden Wellen der Parasitämie des Patienten werden dadurch erklärt. Der Wechsel zur Expression eines anderen VSGs kann durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen: Entweder wird durch so genannten *in situ* Wechsel eine andere ES aktiviert, oder durch (segmentelle) Genkonversion ein inaktives VSG- (Pseudo-) Gen in die aktive ES gebracht (Pays et al. 2004). Die Tatsache, dass Trypanosomen der antikörpervermittelten Immunantwort stets einen Schritt voraus sind, ermöglicht ihnen oftmals jahrelange Persistenz im Wirt und erschwert die Entwicklung effizienter Impfstoffe.

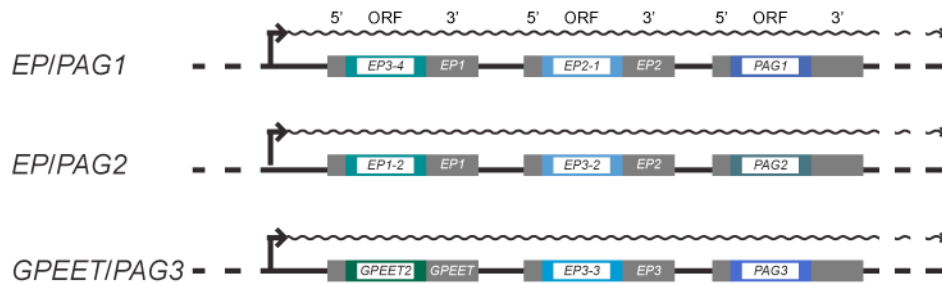
### 1.4.2 Prozykline

Prozykline sind die Hautoberflächenproteine der prozyklischen Insektenform von *T. brucei* [siehe Abb. 5 (B)]. Die Verankerung in der Plasmamembran erfolgt über GPI-Anker, die lange, heterogene Seitenketten aus Poly-*N*-Acetyllactosamin Einheiten tragen. Mit ca.  $2,2 \times 10^6$  Molekülen sind Prozykline die abundantesten Proteine in PCF (Acosta-Serrano et al. 1999). In BSF ist die mRNA schwer nachzuweisen, die Proteine sind nicht detektierbar. Die Halbwertszeit der mRNA beträgt in BSF etwa 5 min, in PCF hingegen über 1 h (Hotz et al. 1998). Im Blut von Säugetierwirten gefundene anti-Prozyklin Antikörper (Liu und Pearson 1987), deuten jedoch auf eine Expression in zumindest einigen Zellen auch im Blut hin.

---

<sup>1</sup> *T. brucei* Genomprojekt: [http://www.sanger.ac.uk/Projects/T\\_brucei/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/T_brucei/)

Unkoordinierte Prozyklinexpression wäre mit dem Mechanismus der antigenen Variation nicht kompatibel, da die Erkennung der invarianten Prozykline auf der Zelloberfläche durch das Immunsystem letal wäre. Die Erforschung der Expressionskontrolle der Oberflächenproteine von *T. brucei* wird deshalb auch aufgrund möglicher therapeutischer Angriffspunkte vorangetrieben.



**Abb. 6: Genomische Prozyklin Loci**

Übersicht (nicht maßstabsgetreu) der genomischen Prozyklin Loci in *T. brucei* inkl. cotranskribierte Prozyklin assoziierte Gene (PAG). Modifiziert nach Vorlage aus Vassella et al. (2001). Promotoren der DNA-Polymerase I sind durch Pfeile dargestellt. Polycistronische Transkriptionseinheiten der Pol I sind durch Zickzack-Linien symbolisiert. 5'- bzw. 3'UTR-Bereiche sind grau dargestellt, offene Leserahmen (ORF) sind farbig gekennzeichnet. Das diploide Genom von *T. brucei* enthält zwei nicht zu unterscheidende Kopien des GPEET/PAG3-Lokus.

Im Gegensatz zum VSG-Oberflächenprotein werden von jeder Zelle zeitgleich mehrere Prozyklingene transkribiert (Ruepp et al. 1997). Es gibt zwei Prozyklin Subtypen, die GPEET und EP bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich vor allem in repetitiven, internen Gly-Pro-Glu-Glu-Thr (G-P-E-E-T im Buchstaben-Code) Pentapeptid- oder Glu-Pro (E-P) Dipeptid-Motiven an ihrem C-Terminus (Roditi und Clayton 1999). Der EP-Subtyp wird weiterhin in drei Isoformen (EP1-3) eingeteilt, die sich in spezifischen Aminosäuren an den N-terminalen Domänen und durch ihr N-Glykosylierungsmuster unterscheiden. EP1 und EP3 sind in der N-terminalen Domäne am Asp29 N-glykosyliert ( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ) (Mehlert et al. 1998), EP2 ist nicht glykosyliert. Die genomischen Prozyklin Loci sind in Abb. 6 dargestellt. Manche Trypanosomenstämme (nicht jedoch die in dieser Arbeit verwendeten) besitzen eine zusätzliche Kopie eines EP Gens, die auf eine Genduplikation zurückgeführt wird (Konig et al. 1989). GPEET ist an einigen Threoninen der repetitiven Sequenz phosphoryliert (Mehlert et al. 1999). Die hierfür verantwortliche GPEET-Kinase ist in der flagellaren Tasche lokalisiert (Schlaeppli et al. 2003). Die Sequenzierung von Prozyklingenen, sowie Untersuchungen der Expression mit Matrix-assisted Time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) zeigen, dass die EP-Isoformen in verschiedenen *T. brucei* Stämmen und sogar in verschiedenen Kulturen desselben Stammes in der Anzahl der Dipeptidwiederholungen variieren können. Durch MS (Vassella et al. 2001) sowie Real Time PCR (Urwylar et al. 2005) wurde ferner die differenzielle Regulation der verschiedenen Prozykline nachgewiesen: 3-6 h nach Beginn der synchronen Differenzierung von stumpy Trypanosomen *in vitro* wird die Expression aller Prozykline coinduziert. Innerhalb von 24 h ändert sich diese Verteilung, sodass in frühen PCF (im Mitteldarm der Fliege), der Oberflächenmantel vor allem aus GPEET besteht. Bei der Differenzierung zu späten PCF nach sieben bis neun Tagen, wird die GPEET-Expression herabreguliert, während glykosylierte EP-Isoformen (später vor allem EP1) exprimiert bleiben.

Die gleiche Abfolge wurde auch nach Infektion von Tsetsefliegen beobachtet. Allerdings standen hierbei nicht genug Parasiten für die Untersuchung früher Zeitpunkte (bis zum dritten Tag) zur Verfügung (Acosta-Serrano et al. 2001).

Die Analyse der Prozyklin Loci verschiedener Zelllinien zeigt, dass die Reihenfolge der codierenden Bereiche z. T. variiert, während die 3'UTRs in allen untersuchten Fällen gleich angeordnet sind. Die Abfolge der Prozyklingene der beiden in dieser Arbeit untersuchten Stämme ist identisch (Vassella et al. 2003). Sie haben einheitliche 5'UTRs und die Intergenregionen (IGR) sind zu 98% homolog. Die stadienspezifische Expression der Prozyklone wird größtenteils durch die 3'UTR vermittelt (Berberof et al. 1995; Hotz et al. 1995; Schurch et al. 1997) und kann somit auf Reportergene übertragen werden (Vassella et al. 2001).

Ergebnisse, die zeigen, dass die N-terminalen Domänen aller Prozyklone in der Fliege, nicht aber in Kultur quantitativ proteolytisch gespalten werden, stärken die Hypothese, dass Protease resistente C-terminale Domänen an der Oberfläche des Parasiten zum Schutz gegen proteolytische Enzyme im Verdauungstrakt der Fliege benötigt werden (Acosta-Serrano et al. 2001; Liniger et al. 2003; Liniger et al. 2004). Auch eine Beteiligung dieser Oberflächenproteine am Transport des Parasiten durch die Fliege wird in Betracht gezogen.

Für Mutanten, die nach Deletion aller Prozyklin Gene freie GPI-Anker auf ihrer Oberfläche tragen, wurde bei BSF kein Phänotyp detektiert (Vassella et al. 2003). Die Differenzierung zu PCF [überprüft durch entsprechende Veränderungen der Morphologie, der Position des Kinetoplasten, Verlust des VSG-Mantels und Expression des „Cytoskeleton-Associated“ Protein (CAP) 5.5 Markerproteins (Hendriks et al. 2000)] war nach zweimonatiger Adaptierungsphase selbst in Prozyklin Nullmutanten möglich. Die Effizienz für die Etablierung von Infektionen in der Tsetsefliege ist bei Zelllinien, die nur noch ein *GPEET*-Allel exprimieren (Ruepp et al. 1997) oder bei denen durch genetische Veränderung in der GPI-Synthese eine Prozyklin-freie Oberfläche erreicht wurde (Nagamune et al. 2000), stark verringert. Deletions-Mutanten zeigen, dass unter den getesteten Bedingungen weder die Expression der Prozyklone (Vassella et al. 2009), noch der sechs Prozyklin assoziierten Gene (Haenni et al. 2006) für die zyklische Transmission durch die Fliege nötig sind. Die Funktion des Prozyklin Oberflächenmantels bleibt demnach weiterhin unklar.

### 1.4.3 *Brucei* Alanin-reiche Proteine

Entgegen der ursprünglichen Annahme wurde gezeigt, dass in der epimastigoten Fliegenform die exprimierte Prozyklin mRNA *in vivo* nicht translatiert wird (Urwylers et al. 2005). Es gibt deutliche Hinweise dafür, dass epimastigote *T. brucei* stattdessen von einem Mantel aus GPI-verankerten, *Brucei* Alanin-reichen Proteinen (BARP) umgeben sind (Urwylers et al. 2007). Die heterogene BARP-Familie zeigt nur wenig Sequenzhomologie zum EP-Protein, ist jedoch entfernt verwandt zum Glutaminsäure Alanin-reichen Oberflächenprotein (GARP) der prozyklischen Form von *T. congolense* (Bayne et al. 1993). In einer Population werden (möglicherweise von verschiedenen Zellen) zur



selben Zeit mehrere BARP-Subtypen exprimiert. Die 3'UTRs der verschiedenen *BARP*-Gene sind sich ähnlicher als die entsprechenden codierenden Bereiche. Es gibt Hinweise dafür, dass auch hier die 3'UTR an der Regulation beteiligt ist. Untersuchungen an diesem Lebensstadium gestalten sich jedoch schwierig, da bislang keine geeigneten *in vitro* Kulturmethoden gefunden wurden.

## 1.5 Besonderheiten der Genexpression

Die Genomsequenzierungen der verwandten Pathogene *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* und *Leishmania major* (Berriman et al. 2005; El-Sayed et al. 2005; Ivens et al. 2005) zeigen übereinstimmend, dass proteincodierende Gene in langen, bidirektionalen, teilweise überlappenden (Liniger et al. 2001), polycistronischen Einheiten organisiert sind. Der einzige bisher bekannte Promotor für die RNA-Polymerase (Pol) II initiiert die Transkription der „spliced leader“ (SL) -RNA Gene (Gillinger und Bellofatto 2001). In den anderen Fällen erfolgt dies vermutlich an den Strangwechsel-Regionen der Chromosomen (Martinez-Calvillo et al. 2003). Es gibt dementsprechend in diesen Organismen mit wenigen Ausnahmen keine Möglichkeit der Genregulation auf der Ebene der Transkriptionsinitiation.

Als zusätzliche Besonderheit ist *cis*-Spleißen bei Trypanosomen bislang nur für ein einziges Gen beschrieben [Poly-A Polymerase (Mair et al. 2000)]. Das zeigt, dass die benötigten zellulären Komponenten prinzipiell vorhanden sind, jedoch nur eine untergeordnete Rolle spielen. Stattdessen werden polycistronische Vorläufer mRNAs cotranskriptionell durch einen Mechanismus prozessiert, bei dem *trans*-Spleißen und Polyadenylierung räumlich und zeitlich gekoppelt sind [zusammengefasst von Liang et al. (2003)]. Auf diese Weise wird an alle bekannten proteincodierenden mRNAs an das 5'-Ende die 39 nt lange SL-RNA mit 7-Methylguanosin Cap-Struktur angefügt. Das entsprechende Gen steht dazu in über 200 in Clustern angeordneten Kopien zur Verfügung (Nelson et al. 1983). Für das Schneiden und die Polyadenylierung des 3'-Endes sind bei Trypanosomatiden keine spezifischen Konsensussignale bekannt. Als Spleiß-Akzeptor-Stelle dient das erste AG-Dinukleotid, das einem Polypyrimidintrakt folgt. Die Polyadenylierungsstelle liegt 100-300 nt vor dem *trans*-Spleiß-Signal [zusammengefasst von Vanhamme und Pays (1995)]. Die Polyadenylierung ist abhängig vom Spleißen des folgenden Gens, weshalb eine generelle Beteiligung des Spleißmechanismus an der Genregulation unwahrscheinlich ist. Die exakten Mechanismen, die zur Auswahl der korrekten Prozessierungsstellen führen, sind unklar. Durch Computerprogramme berechnete Vorhersagen (Benz et al. 2005) sind deshalb oft ungenau und können die experimentelle Charakterisierung meist nicht ersetzen.

Die polycistronische Transkription bei *T. brucei* erzeugt Einheiten aus z. T. mehreren hundert Genen mit unterschiedlicher Funktion. Cotranskribierte Gene werden hierbei nicht generell coreguliert, wie es von bakteriellen Operons bekannt ist. Die stark variierende Expression benachbarter Gene solcher Transkriptionseinheiten in verschiedenen Stadien des Lebenszyklus wie z. B. bei den verschiedenen Prozyklen oder den Phosphoglycerat-Kinasen (PGK) A, B und C wird im Gegensatz

zu anderen Eukaryonten fast ausschließlich durch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen erreicht. Hierbei können auch mRNA-Prozessierung oder der Export aus dem Nukleus beteiligt sein. Für den größten Teil bisher getesteten mRNAs wurde jedoch gezeigt, dass die Expression vor allem über die Kontrolle der mRNA-Degradierung und/oder Translation reguliert wird [zusammengefasst von Clayton (2002)]. Die entsprechenden Signale sind in den meisten Fällen in den 3'UTRs lokalisiert [zusammengefasst von Clayton und Shapira (2007)]. Entsprechende Mechanismen zur Regulation der Translation durch die 3'UTR wurden von Sonenberg and Hinnebusch (2009) zusammengefasst. Die Reduktion dieser Abschnitte auf konkrete *cis*-Elemente konnte bislang nur in Ausnahmefällen erreicht werden. Häufig erwies sich eine Eingrenzung auf weniger als einige Hundert Nukleotide als unmöglich (Boucher et al. 2002; Clayton und Shapira 2007). Durch Deletionsanalysen unbeabsichtigt herbeigeführte Veränderungen in der Sekundärstruktur, sowie das Zusammenspiel verschiedener 3'UTR-Bereiche, erschweren derartige Untersuchungen. Die ungewöhnlich große Anzahl von mutmaßlichen RNA-bindenden Proteinen, die in den Genomdatenbanken der verwandten Pathogene *T. brucei*, *T. cruzi* und *Leishmania major* identifiziert wurden, deutet darauf hin, dass in diesen früh von der eukaryontischen Hauptlinie abgespaltenen Organismen möglicherweise atypische und neuartige RNA-Regulatoren gefunden werden können. An den posttranskriptionellen Regulationsmechanismen beteiligte *cis*- sowie *trans*-Elemente sind bislang jedoch weitestgehend unbekannt [zusammengefasst von Haile und Papadopoulou (2007)].

Die Gene für die Haupt-Oberflächenproteine von *T. brucei* werden von der RNA-Pol I transkribiert (Hotz et al. 1998). Die Cap-Struktur wird wie bei allen anderen Genen durch *trans*-Spleißen mit der SL-RNA übertragen. Im Gegensatz zu den Transkriptionseinheiten der RNA Pol II, sind hier jedoch definierte Promotorstrukturen bekannt. Erst durch die etwa zehnfach höhere Transkriptionsrate der RNA-Pol I, werden die in den entsprechenden Stadien nötigen Expressionsniveaus von wenigen Genkopien im Genom ermöglicht. „Nuclear run on transcription“ Experimente haben gezeigt, dass die VSG- und Prozyklin Promotoren beide sowohl in BSF als auch in PCF aktiv sind. Wahrscheinlich führen Veränderungen in der Chromatinstruktur zur fünf- bis zehnfachen Verringerung der Transkriptionsrate von Prozyklin in BSF (Vanhamme et al. 1995; Biebinger et al. 1996). Dies reicht jedoch nicht aus, um die Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Stadien zu erklären. Die Prozyklinexpression wird hauptsächlich durch Sequenzelemente in der 3'UTR reguliert, die stadienspezifisch zur (De-) Stabilisierung der mRNA und Aktivierung/Inhibierung der Translation führen. Da die Behandlung von BSF mit verschiedenen Inhibitoren der Proteinsynthese zu einer Anreicherung von Prozyklin mRNA führt (Dorn et al. 1991), ohne jedoch die Transkription zu erhöhen (Graham und Barry 1996), wird postuliert, dass bislang unbekannte, labile Proteine die Expression in BSF inhibieren.

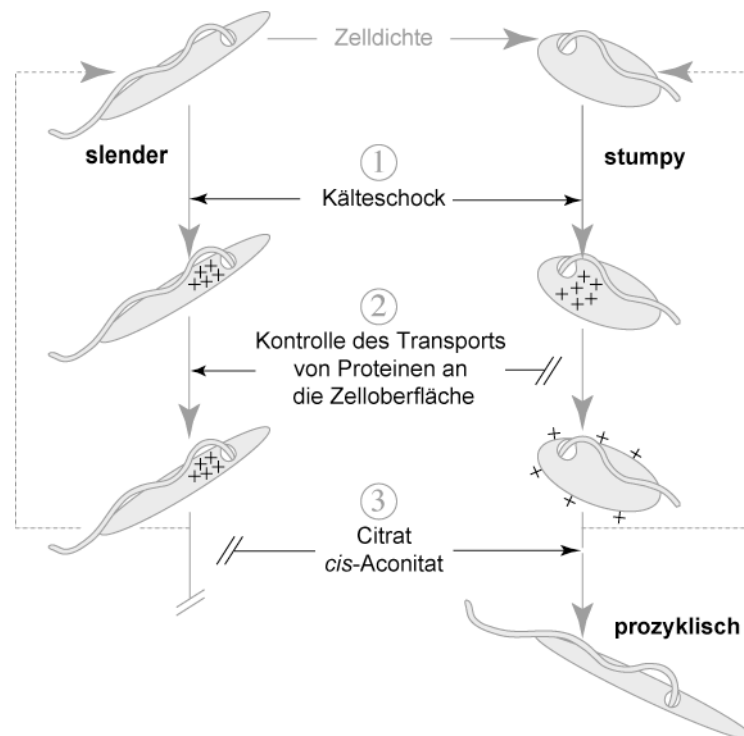
Versuche mit verschiedenen Reportergenen zeigen, dass der Einfluss der 3'UTR unabhängig von der codierenden Region ist (Furger et al. 1997). Dennoch hat zusätzlich in BSF auch die codierende Sequenz des Prozyklins Einfluss auf die Regulation, da die mRNA-Expression nach Integration der Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) oder *GARP* Leserahmen in den Prozyklin Locus im Vergleich zu Zelllinien mit Prozyklin ORF ansteigt (Schurch et al. 1997). Die Proteinprozessierung, Lokalisierung und die Kontrolle des Zugangs zur Zelloberfläche (Engstler und Boshart 2004), stellen weitere mögliche Ebenen des komplexen Mechanismus der Prozyklinregulation dar.

## 1.6 *In vitro*-Differenzierung und Kälteschock

Die mit dem Wirtswechsel einhergehenden Veränderungen der Umweltbedingungen erfordern Anpassungen des Parasiten, die sich in den unterschiedlichen Lebensstadien von *T. brucei* widerspiegeln. Der Übergang von BSF zu PCF kann *in vitro* durch Verringerung der Temperatur auf 27 °C und Zugabe von Citrat oder *cis*-Aconitat ins Medium induziert werden (Brun und Schonenberger 1981; Czichos et al. 1986). Es wurde gezeigt, dass diese Stoffe ausschließlich extrazellulär wirken (Fast 2000). Für weitere Bedingungen wie Glukosedepletion (Milne et al. 1998), leicht saurem pH-Wert des Mediums, proteolytischem Stress (Rolin et al. 1998; Nolan et al. 2000) sowie erhöhte Osmolarität wurden ebenfalls geringe Effekte auf die *in vitro* Differenzierung beschrieben. Die Expression von Prozyklin sowie der Verlust des VSG-Mantels sind die ersten Kennzeichen der Differenzierung. Die Prozyklin mRNA wird bereits 15 min nach Induktion der Differenzierung nachgewiesen, das Protein ist innerhalb von 2 h detektierbar. Im weiteren Verlauf kommt es zur Repositionierung des Kinetoplasten und zum Wiedereintritt in den Zellzyklus [zusammengefasst von Matthews et al. (2004) bzw. Kabani et al. (2009)].

Es wurde gezeigt, dass ein Kälteschock (Temperaturunterschied >15 °C) in BSF, die unter normalen Wachstumsbedingungen (37 °C) kein Prozyklin exprimieren, innerhalb von Stunden zu einer dramatischen Proteininduktion (65-fach) führt (Engstler und Boshart 2004). Dieser Effekt ist reversibel. Die optimale Induktion wird bei einer Inkubationstemperatur von 20 °C erreicht. Weder der chromosomale Locus, noch der verwendete Promotor spielen dabei eine Rolle. Die codierende Sequenz und die 5'UTR haben ebenfalls keinen Effekt auf die Kälteschockinduktion. Die *EP1* 3'UTR alleine ist für die Induktion nötig und ausreichend. Für zwei 3'UTR-Mutationen wurde exemplarisch gezeigt, dass die Induktion durch Kälteschock nicht durch Unterschiede der mRNA-Prozessierung erreicht wird.

Bei induzierter Prozyklinexpression kontrolliert ein weiterer, vom Kälteschock unabhängiger und bislang nicht genauer verstandener Mechanismus („surface access control“) den Transport von Prozyklin auf die Zelloberfläche (Engstler und Boshart 2004). In slender BSF wird das Prozyklin in der Zelle zurückgehalten, während es bei den im Zellzyklus arretierten stumpy BSF auf die Zelloberfläche transportiert wird.



**Abb. 7: Modell zur Regulation der Differenzierung von *T. brucei* BSF zu PCF**

Graue Pfeile stellen Übergänge zwischen definierten funktionellen- oder Entwicklungsstadien dar. Revertierbare Effekte sind durch gestrichelte Linien symbolisiert. Die schwarzen Pfeile zeigen die Schritte (1-3) zur Differenzierung. Durch Kälteschock induzierte Oberflächenproteine (Prozyklin sowie der postulierte Citrat/*cis*-Aconitat Rezeptor) sind durch Kreuze symbolisiert [nach Engstler und Boshart (2004)].

Die für die *in vitro* Differenzierung benötigte Menge an *cis*-Aconitat ist unter Standardbedingungen relativ hoch (6 mM). Ein weiterer Effekt der Kälteschockinduktion ist, dass stumpy Zellen für *cis*-Aconitat bzw. Citrat hypersensitiv werden, so dass physiologische (mikromolare) Konzentrationen ausreichen, um die Differenzierung zu PCF einzuleiten (siehe Abb. 7). Die jeweiligen Stereoisomere *trans*-Aconitat bzw. Isocitrat zeigen keinerlei Effekt. Nach dieser Beobachtung ist sehr wahrscheinlich, dass der Mechanismus der Kälteschockregulation eine zentrale Rolle im Differenzierungsprozess von Trypanosomen spielt. Anders als das Tetrazyklin (Tet) -induzierbare System, das einzige bekannte System, dass in *T. brucei* vergleichbare Induktionen erlaubt (Wirtz und Clayton 1995), basiert die Kälteschockinduktion vollständig auf endogener Genregulation. Diese wirkt bei Kinetoplastiden bis auf wenige Ausnahmen ausschließlich posttranskriptionell, vor allem durch Regulation von mRNA-Abbau sowie Translationseffizienz [zusammengefasst von Haile und Papadopolou (2007)] (siehe 1.5) und werden meist über die 3'UTR vermittelt. Für die Regulation der Prozyklinexpression wird ein Mechanismus vermutet, bei dem neben der Sequenz auch die Sekundärstruktur der 3'UTR beteiligt ist. Denkbar wäre die kontrollierte Bindung von (de-)stabilisierenden Proteinen an die mRNA, die über temperaturabhängige Veränderungen der Sekundärstruktur (vergleichbar mit RNA-Thermometern in Bakterien) reguliert wird.

Nachdem auch Zelllinien mit 3'UTR-Deletionen der nt 1-164 oder 101-173 nach Kälteschock noch Induktion zeigten, wurde das regulatorische Element in den verbleibenden nt 173-297 postuliert. Innerhalb dieses Sequenzbereichs (nt 181-193) wurde eine weitgehende Homologie zum Konsensusmotiv eines RNA-bindenden Proteins (FRGY2) aus *Xenopus laevis* identifiziert (Engstler

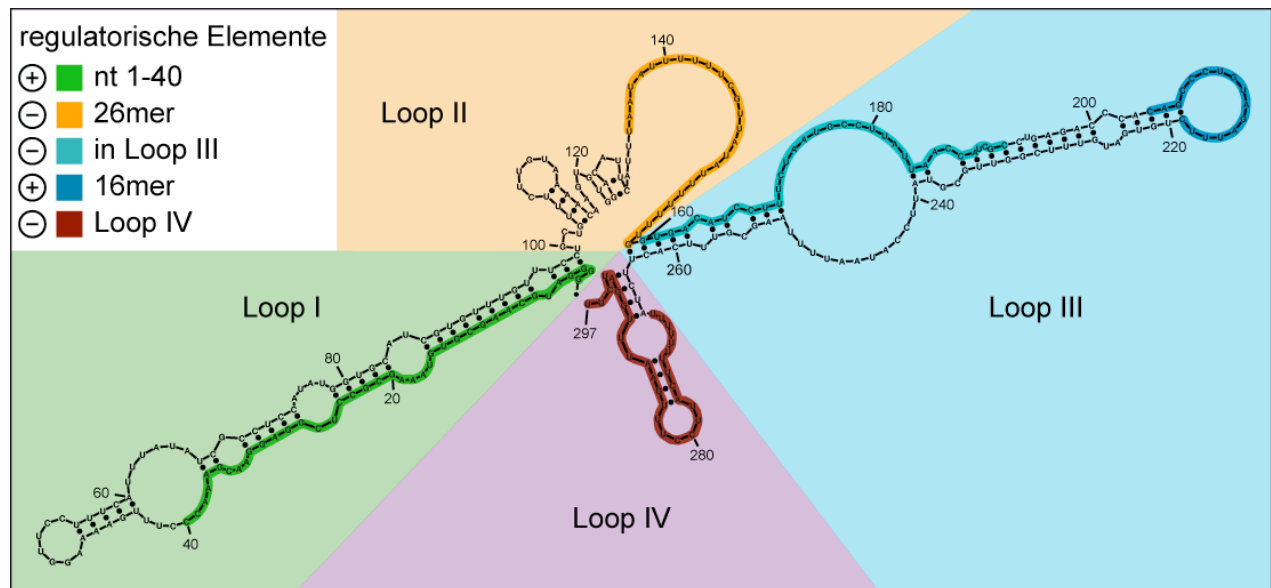
und Boshart, unpublizierte Daten), das durch SELEX<sup>2</sup>-Analyse mit der DNA-bindenden Cold Shock Domäne (CSD, Interpro: IPR002059) von FRGY2 identifiziert wurde (Manival et al. 2001). Für diese von Bakterien bis zu höheren Pflanzen funktionell konservierte Proteindomäne (Nakaminami et al. 2006) ist in zahlreichen Beispielen und in den verschiedensten Organismen von Bakterien bis zum Menschen eine Beteiligung an der stress- oder kälteschockabhängigen Genregulation beschrieben [zusammengefasst von Wistow (1990) bzw. Jones und Inouye (1994)]. In welcher Form dieser Sequenzabschnitt bei der Kälteschockregulation der Prozyklinexpression eine Rolle spielt, wurde in dieser Arbeit durch gezielte Mutationen untersucht.

## 1.7 Regulatorische *cis*-Elemente der Prozyklin 3'UTRs

Die Entwicklung der letzten Jahre verdeutlicht zunehmend, dass mRNA mehr darstellt als nur das Substrat für die Ribosomen. Vielmehr können mRNAs Elemente beinhalten, die ihre Expression in Abhängigkeit verschiedener Konditionen modulieren. Veränderungen der Umweltbedingungen wie Temperatur oder Nährstoffangebot können strukturelle Veränderungen solcher sensorischen mRNAs verursachen. In Prokaryonten wurden regulatorische mRNAs beschrieben, deren Struktur temperaturabhängig variiert und so Bindungsstellen für Proteine freigeben können [RNA-Thermometer, zusammengefasst von Narberhaus et al. (2006)]. Es werden zwei Klassen dieser RNA-Elemente unterschieden: i) *cis*-wirksame Elemente sind auf derselben mRNA codiert und ii) nichtcodierende, *trans*-wirksame RNAs, die an komplementäre Sequenzen von mRNAs binden. Auch wenn bislang kein Beweis für die Existenz von *trans*-wirksamen RNAs in Trypanosomatiden erbracht wurde (Haile und Papadopoulou 2007), ist die nötige Maschinerie in *T. brucei* vorhanden und entsprechende Mechanismen sind durchaus vorstellbar. Regulatorische *cis*-wirksame mRNA-Elemente sind für die Prozyklin mRNA bereits beschrieben. Verschiedene Sequenzabschnitte in der 3'UTR beeinflussen die Expression positiv oder negativ. Sie haben Effekte in BSF und PCF, allerdings unterscheidet sich das jeweilige Ausmaß (Schurch et al. 1997). Die genauen Wirkungsmechanismen dieser Elemente sind jedoch unklar. Für die durch Kälteschock induzierte Expression von Prozyklin ist die 3'UTR nötig und hinreichend (Engstler und Boshart 2004). Die in dieser Arbeit durchgeführte Mutationsanalyse soll Sequenzbereiche identifizieren, welche an der kälteschockabhängigen Regulation der Prozyklinexpression beteiligt sind. Zusätzlich können durch die Gegenüberstellung der Expressionsniveaus von BSF und PCF Zelllinien Unterschiede zwischen kälteschockabhängiger- und stadienspezifischer Regulation identifiziert werden. Sowohl die Nukleotidsequenz als auch die mRNA-Struktur können die Genregulation beeinflussen. Das experimentell validierte Sekundärstrukturmodell der *EP1* 3'UTR nach Drozd und Clayton (1999) ist in Abb. 8 dargestellt.

---

<sup>2</sup> SELEX: Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung



**Abb. 8: Sekundärstrukturmodell der *EP1* 3'UTR**

Modifiziert nach Vorlage von Drozd und Clayton (1999). Loop-Strukturen und regulatorische *cis*-Elemente sind farbig hervorgehoben.

### 1.7.1 Positives Element in Loop I (nt 1-40)

Die Deletion der ersten 40 Nukleotide der *EP1* 3'UTR reduziert die Prozyklinexpression durch Beeinflussung der mRNA-Stabilität und der Translation sowohl in BSF (Schurch et al. 1997) als auch in PCF (Furger et al. 1997). In dieser Sequenz befindet sich dementsprechend ein positives Element.

### 1.7.2 26mer: negatives Element in Loop II (nt 134-159)

Das 26mer (Hotz et al. 1997) ist eine 26 nt lange, polypyrimidinreiche Sequenz aus zwei U-reichen Abschnitten, die durch einen weniger konservierten Bereich getrennt sind. Es wurde zunächst auch als H-Element beschrieben (Clayton und Hotz 1996). Die U-reichen Sequenzen befinden sich in den 3'UTRs aller Prozyklin mRNAs und mit geringen Sequenzabweichungen auch in der 3'UTR der mRNA für das analoge Oberflächenprotein GARP der prozyklischen Form von *T. congolense* (Bayne et al. 1993). Die Sequenz hat große Ähnlichkeiten zu den destabilisierenden AU-reichen Elementen, die in zahlreichen Säugetier-mRNAs gefunden wurden (Barreau et al. 2005). Das 26mer liegt in der Prozyklin mRNA als einzelsträngiger Bereich mit variabler Sekundärstruktur im Loop II vor [siehe Drozd und Clayton (1999) und Tab. 2]. Durch Destabilisierung der mRNA und Repression der Translation in BSF reguliert es die stadienspezifische Expression von Prozyklin (Furger et al. 1997; Hotz et al. 1997; Schurch et al. 1997; Wilson et al. 1999; Irmer und Clayton 2001).

Der Austausch dieser Sequenz gegen unverwandte, funktionell neutrale Nukleotidsequenzen bzw. die exakte Deletion des 26mers führten in BSF zu über hundertfachem Ansteigen der Reporterexpression. Der Effekt des 26mers scheint vom Kontext der Prozyklin 3'UTR abhängig zu sein, da es in die Aktin 3'UTR integriert keinen Effekt hat. Möglicherweise haben die benachbarten Sequenzen oder die Sekundärstruktur Einfluss auf die Funktion des 26mers.

Die Beteiligung dominanter, negativer Elemente mit Ähnlichkeiten zum 26mer an der Genregulation wurde auch für weitere PCF spezifische Gene gezeigt [Cytochrom Oxidase (COX) V (Mayho et al. 2006), Phosphoglycerat-Kinase (PGK) B und Pyruvat Phosphat Dikinase (PPDK) (Quijada et al. 2002)]. Durch bioinformatischen Vergleich (Mayho et al. 2006) der Oligonukleotidfrequenzen einer Microarrayanalyse (Brems et al. 2005) wurde gezeigt, dass das Kernelement des 26mers (UAU UUU UU) in den 300 nt, die den ORFs von PCF-spezifischen mRNAs folgen, viermal häufiger repräsentiert ist als in BSF spezifischen Sequenzen.

### 1.7.3 Negatives Element in Loop III

Die in der *EP1* 3'UTR unmittelbar dem 26mer folgende Sequenz, ist ein schwaches, negatives Element (in Loop III), das bislang nur für BSF gezeigt- und nicht genauer eingegrenzt werden konnte. Die Deletion der nt 159-197 erhöht die Expression von Reporterzelllinien in BSF leicht (Hotz et al. 1997). Die gleiche Auswirkung hat das Ersetzen der nt 171-180 mit einer unverwandten Nukleotidsequenz (Wilson et al. 1999). In beiden Fällen ist der Effekt geringer als der des 26mers.

### 1.7.4 16mer: positives Element in Loop III (nt 204-219)

Innerhalb der 3'UTRs aller Prozyklingene und auch in der 3'UTR des Gens für das GARP Oberflächenprotein der prozyklischen Form von *T. congolense* (Bayne et al. 1993) wurden 16 Nukleotide mit konservierter Sequenz und Struktur identifiziert (Hehl et al. 1994). Dieses 16mer bildet die charakteristische, terminale Schleife des zum großen Teil doppelsträngigen Loop III (siehe Abb. 8). Sowohl Sequenz, als auch Sekundärstruktur haben Auswirkungen auf die Expression von Reportergenkonstrukten. Das 16mer beeinflusst die RNA-Stabilität (Furger et al. 1997; Schurch et al. 1997) und auch die Translation (Hehl et al. 1994) durch Unterstützung der Bindung von mRNA an die Polysomen (Roditi et al. 1998).

### 1.7.5 Glyzerin-abhängiges Element der *GPEET* 3'UTR (nt 160-184)

Trotz hoher Sequenzhomologie zur *EP1* 3'UTR wurde in der *GPEET* 3'UTR ein spezifisches, regulatorisches Element nachgewiesen. Dieses Glyzerin-abhängige Element (GRE) ist 25 nt lang und befindet sich unmittelbar neben dem 26mer, ist also Teil des Loop III. Die *GPEET*-Expression wird in Kultur durch Glyzerinzugabe induziert. In transient transfizierten Zelllinien führt die Deletion des GRE in späten PCF zu 48-fachem Ansteigen der Reporteraktivität. Bei frühen PCF (das Stadium im Mitteldarm der Fliege) konnte im Gegensatz dazu eine Halbierung gemessen werden. Je nach Stadium, kann das GRE in der *GPEET* 3'UTR entweder als ein negatives- (späte PCF) oder schwaches positives Element (frühe PCF) wirken. Es wurde weiterhin gezeigt, dass das GRE an den Mechanismen der *GPEET*-Induktion nach Glukosedepletion, sowie der Herabregulierung der *GPEET*-Expression während der Entwicklung von frühen zu späten PCF in der Fliege beteiligt ist. Jedoch sind zusätzliche Bereiche für die vollständige Aktivität nötig (Vassella et al. 2000; Vassella et al. 2004).

## 1.8 Kandidaten für *trans*-Faktoren der Kälteschockregulation

Neben der Mutationsanalyse zur Identifikation von *cis*-Elementen in der *EP1* 3'UTR, wurde eine Beteiligung ausgewählter Kandidatenproteine als *trans*-Faktoren am Mechanismus der Kälteschockinduktion von Prozyklin untersucht.

### 1.8.1 Endogene RNAi-Maschinerie

Die Entdeckung von RNAi (Fire et al. 1998) zeigte neue Mechanismen für die Genregulation auf, die *in vivo* sowohl transkriptionell, als auch posttranskriptionell wirken können. Durch spezifische, doppelsträngige RNA wird die Degradierung von homologen Transkripten ausgelöst. Dies führt in einer Vielzahl von Organismen zum Abschalten der entsprechenden Gene. Für Säugerzellen wurde gezeigt, dass die Destabilisierung von mRNA mit AU-reichen Elementen durch die Aktivität von Komponenten der RNAi-Maschinerie, sowie microRNAs beeinflusst wird (Jing et al. 2005). *T. brucei* gehört zu den ersten Organismen, in denen RNAi nachgewiesen wurde (Ngo et al. 1998). Das Vorhandensein der erforderlichen Maschinerie legt die Verwendung dieses Mechanismus für die Genregulation in Trypanosomen *in vivo* nahe, auch wenn bisher kein direkter Beweis erbracht werden konnte [zusammengefasst von Ullu et al. (2004)]. Das *AGO1* Gen (Tb927.10.10850) ist die einzige Komponente des RNAi-Weges, die bislang in *T. brucei* identifiziert wurde. Es ist das funktionelle Homolog des Slicer Proteins und für RNAi in PCF (Durand-Dubief und Bastin 2003; Shi et al. 2004), sowie in BSF (Janzen et al. 2006) essenziell. Eine mögliche Beteiligung der zelleigenen RNAi-Maschinerie an der Regulation der Prozyklinexpression wurde in dieser Arbeit durch Untersuchung der Kälteschockregulation einer Zelllinie mit *ago1* Nullmutation geprüft.

### 1.8.2 PKA-ähnliche Kinase

Die PKA-ähnliche Kinase in *T. brucei* wurde in diesem Labor im Rahmen mehrerer Diplom- und Doktorarbeiten ausführlich charakterisiert. Eine regulatorische (R) (Schulte zu Sodingen 2000; Shalaby et al. 2001) und drei katalytische (C1-3) (Klöckner 1996) Untereinheiten wurden identifiziert. Abweichend von der üblicherweise beobachteten Tetramerbildung (2R+2C) wurden bei *T. brucei* ausschließlich Dimere aus jeweils einer regulatorischen, sowie einer der drei verschiedenen katalytischen Untereinheiten gefunden (Kramer 2004). Obwohl in *T. brucei* weder die Funktion noch der Mechanismus zur Aktivierung dieses Enzyms bekannt sind, wurde aufgrund der stadienspezifisch differenziell regulierten Expression der R-Untereinheit früh ein Zusammenhang mit der Differenzierung postuliert (Schulte zu Sodingen 2000). Mit Hilfe des heterolog exprimierten, spezifischen Reportersubstrates VASP (vasidolator-stimulated phosphoprotein) wurde nachgewiesen, dass Kälteschock, die Aktivität der PKA-ähnlichen Kinase, in Trypanosomen induziert. Inkubation unter normalen Wachstumsbedingungen kehrt diesen Effekt innerhalb weniger Minuten wieder um (Kramer 2004). Experimente mit der Nullmutante der R-Untereinheit der PKA-ähnlichen Kinase (*PKAR*), die keine Kälteschockinduktion mehr zeigt, sowie Versuche mit verschiedenen spezifischen Inhibitoren der katalytischen Untereinheiten, bestätigten diese



Beobachtungen (Pepperl 2007; Bachmaier 2008). Die mit monomorphen BSF festgestellte verzögerte Differenzierung einer  $\Delta pkar/\Delta pkar$  Zelllinie deutet ebenfalls auf eine mögliche Beteiligung dieser Kinase an der Differenzierung von Trypanosomen hin (Pepperl 2007). Inwiefern die PKA-ähnliche Kinase auch die kälteschockabhängige Regulation der Prozyklinexpression beeinflusst, wurde in dieser Arbeit analysiert.

### 1.8.3 Zinkfinger Protein 3

ZFP3 gehört zu einer Gruppe ungewöhnlich kleiner (<140 Aminosäuren), RNA-bindender Proteine mit charakteristischem CCHC Zinkfinger Motiv und WW Domäne. Entsprechende Proteine konnten bislang ausschließlich in Kinetoplastiden identifiziert werden. In *T. brucei*, *T. cruzi* sowie *L. major* sind jeweils drei Vertreter dieser Gruppe bekannt. ZFP1 bindet über die WW Domäne an ZFP2 und ZFP3. Diese werden konstitutiv exprimiert, während ZFP1 nur transient nach der Initiation der Differenzierung zu PCF synthetisiert wird und somit möglicherweise regulierend wirkt. In *T. brucei* konnten durch RNAi- bzw. Überexpressions-Experimente für ZFP1 und ZFP2 Phänotypen gezeigt werden, die eine Beteiligung des Komplexes am Differenzierungsprozess zu PCF nahe legen (Hendriks et al. 2001; Hendriks und Matthews 2005). Das ZFP1 Homolog in *T. cruzi* bindet stark an C-reiche Sequenzen, sowie an das AU-reiche 26mer in der *T. brucei* Prozyklin 3'UTR (Morking et al. 2004), das an der stadienspezifischen Regulation der Prozyklinexpression beteiligt ist (siehe 1.7.2). ZFP3 ist möglicherweise ein positiver Regulator der Prozyklinexpression. Dafür spricht, dass: i) ZFP3 spezifisch im prozyklischen Stadium mit der Translationsmaschinerie interagiert; ii) die Nullmutation in PCF zur signifikanten Reduktion der Menge an Prozyklin mRNA führt; iii) durch ektopische Überexpression die Proteinexpression von Prozyklin-Isoformen verändert wird; iv) in PCF Zellextrakten Anti-ZFP3 Antikörper EP1 und GPEET mRNA mit WT Sequenz oder mit Deletion der ersten 40 nt der 3'UTR co-immunpräzipitieren. Nach Deletion von Loop II oder des 16mers wurde jedoch keine Co-Immunpräzipitation mehr festgestellt (Paterou et al. 2006; Walrad et al. 2009).

Es wurde bereits beschrieben, dass die Effekte der regulatorischen Elemente in Loop II und das 16mer in PCF nicht unabhängig voneinander sind (Furger et al. 1997). Möglicherweise sind beide Elemente für die Bindung von ZFP3 Proteins nötig und bereits die Entfernung eines Elements reicht aus, um eine Co-Immunpräzipitation zu verhindern. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ZFP3 an der Kälteschockregulation der Prozyklinexpression in BSF beteiligt ist.

### 1.8.4 Proteine mit Cold Shock Domäne

In der *EP1* 3'UTR wurde ein Sequenzabschnitt (nt 181-193) mit auffallender Homologie zu einer CSD-Protein Bindestelle identifiziert (Engstler und Boshart, unpublizierte Daten). Bislang ist bei *T. brucei* nur ein einziges CSD-Protein beschrieben. Die Beteiligung dieses RNA-bindenden Proteins (RBP) 16 (Tb11.02.5770) (Hayman und Read 1999), sowie von zwei weiteren in dieser Arbeit identifizierten Kandidatenproteinen mit Cold Shock Domäne (Tb927.4.4520 und Tb927.8.7820) auf die temperaturabhängige Regulation der Prozyklinexpression, wurde in Reporterzelllinien mit induzierbarer RNAi vermittelter Genrepression untersucht.

### 1.9 Genomweite Analyse der Genexpression

Mit der Microarray-Technologie als Hochdurchsatzmethode wird die gleichzeitige Analyse von mehreren tausend Genen und damit die globale Untersuchung biologischer Fragestellungen ermöglicht. Neben kommerziellen Plattformen dienen individuell gefertigte Microarrays den speziellen Anwendungen akademischer Gruppen. Im Gegensatz zu den häufig verwendeten Microarrays exprimierter Sequenzen (EST, expressed sequence tag) sind auf die in dieser Arbeit verwendeten „genome survey sequence“ (GSS) Microarrays nicht PCR-Produkte von cDNA Klonen also exprimierte Gene aufgetragen, sondern PCR-Produkte einer genomischen DNA-Bibliothek von *T. brucei* (Stamm TREU 927/4). Dies hat mehrere Vorteile: i) Können GSS Microarrays universell für verschiedene Konditionen oder Lebensstadien eingesetzt werden. Die aufwändige Herstellung verschiedener cDNA Bibliotheken ist nicht erforderlich. ii) Sind nicht nur Gene, sondern alle genomischen Sequenzen auf dem Microarray repräsentiert. Das beinhaltet mit gleicher Wahrscheinlichkeit z. B. auch UTR- oder IGR-Bereiche, die großen Einfluss auf die bei Trypanosomen überwiegend posttranskriptionelle Genregulation haben können. iii) Die Abdeckung des gesamten Genoms (hier >85%) wird trotz relativ einfacher Klonierung von willkürlichen DNA-Fragmenten mit geringer Redundanz erreicht. Die Nachteile gegenüber der mittlerweile für *T. brucei* ebenfalls zur Verfügung stehenden Oligonukleotid-Array Plattform sind: i) Aufgetragene DNA-Sequenzen einer Durchschnittsgröße von etwa 2 kb können möglicherweise mehr als einen offenen Leserahmen enthalten. Die differenzielle Regulation eines Transkripts kann dementsprechend durch ein starkes Signal eines benachbarten, konstitutiv exprimierten Gens überdeckt werden. ii) Durch die Länge der DNA-Sequenzen steigt die Wahrscheinlichkeit von Kreuz-Hybridisierungen. Die Regulation verschiedener Gene mit nur geringer Sequenzdiversität kann dementsprechend möglicherweise nicht aufgelöst werden. iii) Für die Identifizierung von differenziell regulierten Transkripten ist die nachträgliche Sequenzierung der entsprechenden Bakterienklone der DNA-Bank erforderlich.

## 1.10 Analyse des Phosphoproteoms nach Differenzierungsreizen

Die durch zahlreiche Kinasen vermittelte Phosphorylierung von Proteinen, ist die am besten untersuchte posttranslationale Modifikation eukaryontischer Zellen. Unzählige zelluläre Prozesse werden durch reversible Proteinphosphorylierungen reguliert (Cohen 2000). Da die Gene für die in Eukaryonten weit verbreiteten G-Protein-gekoppelten 7-Transmembran Rezeptoren im Genom von Trypanosomen ebenso fehlen, wie die für Rezeptor-Tyrosinkinasen, muss die Signalübertragung bei Trypanosomen über alternative Wege erfolgen. Bislang ist in Trypanosomen kein Beispiel für eine Verbindung von extrazellulärem Stimulus und einer Signaltransduktionskaskade bekannt. Durch die Analyse differenzieller Proteinphosphorylierungen verschiedener Zelllinien (z. B. WT und Mutante) bzw. nach diversen Stimuli (z. B. Kälteschock, Differenzierung), sollen potentielle Komponenten der entsprechenden Signaltransduktionskaskaden identifiziert werden. Die ersten nach kurzer Induktion (im Minutenbereich) auftretenden Veränderungen, sind hierbei die interessantesten Kandidaten. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur *in vivo* Markierung von Proteinphosphorylierungen in *T. brucei* BSF Zellkulturen mit radioaktivem  $^{32}\text{P}$  (Orthophosphat) etabliert. Die Auftrennung der radioaktiv markierten Proteine erfolgte anschließend für die zu vergleichenden Konditionen parallel durch großformatige, 2D Gelelektrophorese nach isoelektrischem Punkt (pI) und Molekulargewicht (MW). Durch Zeitverlauf-Experimente und den Vergleich verschiedener Reize sollen differenziell phosphorylierte Proteine detektiert werden. Gleichzeitig sollen in folgenden Experimenten diejenigen Konditionen identifiziert werden, die für quantitative iTRAQ<sup>3</sup> Experimente am besten geeignet erscheinen.

---

<sup>3</sup> iTRAQ: Isobarische Markierung zur relativen und absoluten Quantifizierung



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 *Escherichia coli*

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80d/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>deoR thi-1 supE44 <math>\lambda^-</math> gyrA96 relA1</i> (Invitrogen, Karlsruhe)
<i>E. coli</i> DH10B	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80d/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 endA1 recA1 deoR</i> $\Delta$ ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>araD139 galU galK nupG rpsL <math>\lambda^-</math></i> (Invitrogen, Karlsruhe) (Durfee et al. 2008)
<i>E. coli</i> SURE	<i>e14'(McrA') <math>\Delta</math>(mcrCB-hsdSMR-mrr) 171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan') uvrC [F' proAB lac<sup>q</sup> <math>\Delta</math>M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i> (Stratagene, Amsterdam)
<i>E. coli</i> XL10-Gold	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte <math>\Delta</math>(mcrA)183 <math>\Delta</math>(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacIq<math>\Delta</math>M15 Tn10(TetR Amy CmR)]</i> (Stratagene, Amsterdam)

#### 2.1.2 *Trypanosoma brucei brucei*

##### 2.1.2.1 Wildtyp Stämme

<i>T. brucei</i> MITat 1.2	(Molteno Institut Trypanozoon Antigen Typ 1.2) Stock 427, Klon 221 (New York Subklon), monomorphe BSF G. Cross, New York (USA) (Cross und Manning 1973; Cross 1975)
<i>T. brucei</i> MITat 1.4	(Molteno Institut Trypanozoon Antigen Typ 1.4) Stock 427, Klon 117, monomorphe BSF G. Cross, New York (USA) (Cross 1975)
<i>T. brucei</i> AnTat 1.1	(Antwerp Trypanozoon Antigen Typ 1.1) Klon von EATRO 1125 via E. Pays (Brüssel, Belgien) und P. Overath (Tübingen) Differenzierung der pleomorphen BSF zu PCF in diesem Labor (Geigy et al. 1975; Delauw et al. 1985)

##### 2.1.2.2 Transgene Stämme

Die Benennung transgener Zelllinien erfolgte gemäß der Empfehlung zur *T. brucei* Nomenklatur (Clayton et al. 1998). Um das Lesen zu vereinfachen, werden allerdings in den meisten Fällen vereinfachte Namen verwendet, die in der folgenden Übersicht fettgedruckt sind. Alternative Namen sind in Klammern angegeben. Aufgelistet sind sämtliche Zelllinien, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet oder hergestellt wurden. Blutstromformen (MITat) sind links, prozyklische Formen (AnTat) gegebenenfalls rechts angegeben.

## Luc Reporter Zelllinien

<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 <math>\Delta</math>II.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 <math>\Delta</math>II.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Engstler analog zu Schürch et al. 1997	M. Brenndörfer analog zu Furger et al. 1997
<b>Genotyp</b>	<i><math>\Delta ep::LUC (\Delta ep1\ 3'UTR\ 101-172)\ NEO</math></i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool übernommen von M. Engstler	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	04/1997	12/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE $\Delta$ II.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-172 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Referenz</b>	Schürch et al. 1997	Furger et al. 1997
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 WT.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 WT.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Panzer unter Anleitung von M.	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i><math>\Delta ep::LUC\ NEO</math></i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 4	Pool 3
<b>Herstellungsdatum</b>	09/2005	11/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE WT.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	enthält komplette <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 <math>\Delta</math>1-49.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 <math>\Delta</math>1-49.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i><math>\Delta ep::LUC (\Delta ep1\ 3'UTR\ 1-49)\ NEO</math></i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 5	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	12/2005	01/2006
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE $\Delta$ 1-49.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 1-49 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 <math>\Delta</math>1-75.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 <math>\Delta</math>1-75.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i><math>\Delta ep::LUC (\Delta ep1\ 3'UTR\ 1-75)\ NEO</math></i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 1	Pool 2
<b>Herstellungsdatum</b>	12/2005	01/2006
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE $\Delta$ 1-75.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 1-75 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 <math>\Delta</math>174-247.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 <math>\Delta</math>174-247.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i><math>\Delta ep::LUC (\Delta ep1\ 3'UTR\ 174-247)\ NEO</math></i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 3	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	12/2005	01/2006
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE $\Delta$ 174-247.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 174-247 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 inv 208-217.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 inv 208-217.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i><math>\Delta ep::LUC (inv\ ep1\ 3'UTR\ 208-217)\ NEO</math></i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 1	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	12/2005	01/2006
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE inv 208-217.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	Inversion von nt 208-217 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 <math>\Delta</math>IV.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 <math>\Delta</math>IV.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Panzer unter Anleitung von M.	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i><math>\Delta ep::LUC (\Delta ep1\ 3'UTR\ 268-297)\ NEO</math></i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 1	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	10/2005	11/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE $\Delta$ IV.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 267-297 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 <math>\Delta</math>1-173.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 <math>\Delta</math>1-173.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i><math>\Delta ep::LUC (\Delta ep1\ 3'UTR\ 1-173)\ NEO</math></i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 2 (13.03.2003)	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	02/2003	11/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE $\Delta$ 1-173.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 1-173 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Referenz</b>	Diplomarbeit M. Brenndörfer	

<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 Δ1-192.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 Δ1-192.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δep::LUC (Δep1 3'UTR 1-192) NEO</i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 2	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	02/2003	11/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE Δ1-192.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 μg/ml]	G418 [20 μg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 1-192 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Referenz</b>	Diplomarbeit M. Brenndörfer	
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 Δ1-49+174-247.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 Δ1-49+174-247.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δep::LUC (Δep1 3'UTR 1-49; 174-274) NEO</i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 3	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	01/2006	02/2006
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE Δ1-49+174-247.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 μg/ml]	G418 [20 μg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 1-49 sowie 174-247 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 Δ1-49 inv 208-217.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 Δ1-49 inv 208-217.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δep::LUC (Δep1 3'UTR 1-49; inv 208-217) NEO</i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 5	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	12/2005	04/2006
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE Δ1-49 inv 208-217.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 μg/ml]	G418 [20 μg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 1-49 und Inversion der nt 208-217 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 Δ1-49+LIV.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 Δ1-49+LIV.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δep::LUC (Δep1 3'UTR 1-49; 268-297) NEO</i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 2	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	01/2006	03/2006
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE Δ1-49+LIV.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 μg/ml]	G418 [20 μg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 1-49 und 268-297 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 ΔLII+III.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 ΔLII+III.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Panzer unter Anleitung von M.	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δep::LUC (Δep1 3'UTR 101-264) NEO</i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 2	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	09/2005	11/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE ΔLII+III.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 μg/ml]	G418 [20 μg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-263 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 ΔLII inv 208-217.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 ΔLII inv 208-217.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δep::LUC (Δep1 3'UTR 101-172; inv 208-217) NEO</i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 1 (16.07.2003)	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	06/2003	11/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE ΔLII inv 208-217.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 μg/ml]	G418 [20 μg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-172 sowie Inversion von nt 208-217 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Referenz</b>	Diplomarbeit M. Brenndörfer	
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 ΔLII inv 208-212.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 ΔLII inv 208-212.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δep::LUC (Δep1 3'UTR 101-172; inv 208-212) NEO</i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool A4 (08.07.2003)	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	06/2003	11/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE ΔLII inv 208-212.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 μg/ml]	G418 [20 μg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-172 sowie Inversion von nt 208-212 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Referenz</b>	Diplomarbeit M. Brenndörfer	
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 ΔLII inv 210-215.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 ΔLII inv 210-215.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δep::LUC (Δep1 3'UTR 101-172; inv 210-215) NEO</i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 1 (29.07.2003)	Pool 4
<b>Herstellungsdatum</b>	06/2003	12/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE ΔLII inv 210-215.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 μg/ml]	G418 [20 μg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-172 sowie Inversion von nt 210-215 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Referenz</b>	Diplomarbeit M. Brenndörfer	

<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 <math>\Delta</math>LII inv 213-217.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 <math>\Delta</math>LII inv 213-217.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	$\Delta ep::LUC (\Delta ep1\ 3'UTR\ 101-172; inv\ 213-217)\ NEO$	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 2 (29.07.2003)	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	06/2003	11/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE $\Delta$ LII inv 213-217.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-172 sowie Inversion von nt 213-217 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Referenz</b>	Diplomarbeit M. Brenndörfer	
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 <math>\Delta</math>LII m 185-187.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 <math>\Delta</math>LII m 185-187.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	$\Delta ep::LUC (\Delta ep1\ 3'UTR\ 101-172; m\ 185-187)\ NEO$	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 8	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	07/2003	11/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE $\Delta$ LII m 185-187.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-172 und Punktmutation der nt 185-187 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Referenz</b>	Diplomarbeit M. Brenndörfer	
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 <math>\Delta</math>LII+IV.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 <math>\Delta</math>LII+IV.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	$\Delta ep::LUC (\Delta ep1\ 3'UTR\ 101-172; 268-297)\ NEO$	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 10	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	05/2005	11/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE $\Delta$ LII+IV.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-172 sowie 268-297 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 <math>\Delta</math>176-297.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 <math>\Delta</math>176-297.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	$\Delta ep::LUC (\Delta ep1\ 3'UTR\ 176-297)\ NEO$	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 4	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	01/2006	02/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE $\Delta$ 176-297.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 176-297 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 Ald.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 Ald.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	$\Delta ep::LUC (\Delta ep1\ 3'UTR::ALD\ 3'UTR)\ NEO$	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 2	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	07/2005	11/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE Ald.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	trunkierte <i>Aldolase</i> 3'UTR (nt 1-177) anstelle <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 <math>\Delta</math>LII+IV+IGR.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 <math>\Delta</math>LII+IV+IGR.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	J. Pepperl unter Anleitung von M.	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	$\Delta ep::LUC (\Delta ep1\ 3'UTR\ 101-172; 268-297; \Delta ep1\ IGR\ 1-274)\ NEO$	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 10	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	04/2005	12/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE $\Delta$ LII+IV+IGR.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-172 und 268-297 der <i>EP1</i> 3'UTR und 1-274 der IGR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 GPEET.Luc</b>	<b>AnTat 1.1 GPEET.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	$\Delta ep::LUC (\Delta ep1\ 3'UTR::GPEET\ 3'UTR)\ NEO$	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 1	Pools 1, 2
<b>Herstellungsdatum</b>	08/2006	09/2006
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE GPEET.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	G418 [20 $\mu$ g/ml]
<b>Bemerkung</b>	GPEET 3'UTR anstelle der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 HSP83.Luc</b>	
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	
<b>Genotyp</b>	$\Delta ep::LUC (\Delta ep1\ 3'UTR::HSP83\ 3'UTR)\ NEO$	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pools 1, 2, 3, 5	
<b>Herstellungsdatum</b>	09/2005	
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE HSP83.Luc	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 $\mu$ g/ml]	
<b>Bemerkung</b>	HSP83 3'UTR anstelle der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	



<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 Lew20.Luc-old (L20.Luc)</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Engstler
<b>Genotyp</b>	<i>RDNA::LUC BLE</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 2
<b>Herstellungsdatum</b>	unbekannt
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pLew20
<b>Selektionsdroge</b>	Bleomycin [1 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-172 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT
<b>Referenz</b>	Engstler et al. 1997

**Luc+ Reporter Zelllinien**

<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 WT.Luc+</b>	<b>AnTat 1.1 WT.Luc+</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Panzer unter Anleitung von M.	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δep::LUC+ NEO</i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 4	Pool 1; 2
<b>Herstellungsdatum</b>	09/2005	09/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE WT.Luc+	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 µg/ml]	G418 [20 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	enthält komplette <i>EP1</i> 3'UTR, Luc+ Reporter aus Promega pGL3 Vektor	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT

<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 ΔLIV.Luc+</b>	<b>AnTat 1.1 ΔLIV.Luc+</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Panzer unter Anleitung von M.	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δep::LUC+ (Δep1 3'UTR 268-297) NEO</i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pools 2; 3	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	10/2005	10/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE ΔLIV.Luc+	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 µg/ml]	G418 [20 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 267-297 der <i>EP1</i> 3'UTR, Luc+ Reporter aus Promega pGL3 Vektor	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT

<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 ΔLII.Luc+</b>	<b>AnTat 1.2 ΔLII.Luc+</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δep::LUC+ (Δep1 3'UTR 101-172) NEO</i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pools 1; 2; 4; 5; 6; 7; 8; 10	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	10/2005	10/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE ΔLII.Luc+	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 µg/ml]	G418 [20 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-172 der <i>EP1</i> 3'UTR, Luc+ Reporter aus Promega pGL3 Vektor	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT

<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 Δ1-173.Luc+</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δep::LUC+ (Δep1 3'UTR 1-173) NEO</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pools 1; 3; 5
<b>Herstellungsdatum</b>	10/2005
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE Δ1-173.Luc+
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 1-173 der <i>EP1</i> 3'UTR, Luc+ Reporter aus Promega pGL3 Vektor
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT
<b>Referenz</b>	

**sonstige Reporter Zelllinien**

<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 ΔLII.EP</b>	<b>AnTat 1.1 ΔLII.EP</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δep::EP (Δep1 3'UTR 101-172) NEO</i>	
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 3	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	07/2007	08/2007
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE ΔLII.EP	
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 µg/ml]	G418 [20 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-172 der <i>EP1</i> 3'UTR	
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT	wie WT

<b>Name</b>	<b>MITat 1.4 ΔLII.EP:EGFP</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δep::EP:EGFP (Δep1 3'UTR 101-172) NEO</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	Klon 2
<b>Herstellungsdatum</b>	08/2007
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGaprone ΔLII.EP:EGFP
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-172 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdopplungszeit</b>	wie WT

**Zelllinien mit Nullmutation**

<b>Name</b>	<b>MITat 1.2.R KO Hyg/Puro cl.2.1</b>
<b>Hergestellt von</b>	C. Krumbholz
<b>Genotyp</b>	<i>Δpkar::HYG Δpkar::PAC</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	Klon 2.1
<b>Herstellungsdatum</b>	1/2007
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pBSK.R KO.Hyg; pBSK.R KO.Puro
<b>Selektionsdroge</b>	Hygromycin [1 µg/ml]; Puromycin [0,05 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Nullmutation der regulatorischen Untereinheit der PKA-ähnlichen Kinase von <i>T. brucei</i>
<b>Verdopplungszeit</b>	9 h
<b>Referenz</b>	C. Krumbholz, in Vorbereitung

<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 WT.Luc in R KO</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>Δpkar::HYG Δpkar::PAC Δep::LUC NEO</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pools 2; 3; 5
<b>Herstellungsdatum</b>	03/2007
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pBSK.R KO.Hyg; pBSK.R KO.Puro; pGAPRONE WT.Luc
<b>Selektionsdroge</b>	Hygromycin [1 µg/ml]; Puromycin [0,05 µg/ml]; G418 [2 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	vollständige <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdopplungszeit</b>	9 h
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 "Single Marker" ago-/-</b>
<b>Hergestellt von</b>	C. Janzen
<b>Genotyp</b>	<i>T7POL TETR NEO Δago1::HYG Δago1::PAC</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	unbekannt
<b>Herstellungsdatum</b>	unbekannt
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	unbekannt
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 µg/ml]; Hygromycin [1 µg/ml]; Puromycin [0,05 µg/ml]
<b>Verdopplungszeit</b>	6,5 h
<b>Referenz</b>	Janzen et al. 2006
<b>Name</b>	<b>MITat 1.2 "Single Marker" ago-/- WT.Luc BLE</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>T7POL TETR NEO Δago1::HYG Δago1::PAC Δep::LUC BLE</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pools 1;2
<b>Herstellungsdatum</b>	05/2008
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pGAPRONE WT.Luc BLE, Rest unbekannt
<b>Selektionsdroge</b>	G418 [2 µg/ml]; Hygromycin [1 µg/ml]; Puromycin [0,05 µg/ml]; 1 Bleomycin
<b>Verdopplungszeit</b>	6,5 h
<b>RNAi Zelllinien</b>	
<b>Name</b>	<b>MITat 1.4 pHD449 (TC 221)</b>
<b>Hergestellt von</b>	B. Fast analog zu (Biebinger et al. 1997)
<b>Genotyp</b>	<i>RDNA::TETR BLE</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	Klon von M. Panzer übernommen, der B. Fast's Stablat benutzte
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pHD449
<b>Selektionsdroge</b>	Bleomycin [1 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Zelllinie mit Tetrazyklin Repressor, verwendet für induzierbares RNAi
<b>Verdopplungszeit</b>	6-7 h
<b>Referenz</b>	Biebinger et al. 1997
<b>Name</b>	<b>MITat 1.4 pHD449 WT.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>RDNA::TETR BLE Δep::LUC NEO</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 2-1
<b>Herstellungsdatum</b>	10/2007
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pHD449; pGAPRONE WT.Luc
<b>Selektionsdroge</b>	Bleomycin [1 µg/ml]; G418 [2 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	vollständige <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdopplungszeit</b>	6-7 h
<b>Name</b>	<b>MITat 1.4 pHD449 ΔLII.Luc</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>RDNA::TETR BLE Δep::LUC (Δep1 3'UTR 101-172) NEO</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	10/2007
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pHD449; pGAPRONE ΔLII.Luc
<b>Selektionsdroge</b>	Bleomycin [1 µg/ml]; G418 [2 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-172 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdopplungszeit</b>	6-7 h
<b>Name</b>	<b>MITat 1.4 pHD449 WT.Luc pHD615 ZFP3 Puro</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>RDNA::TETR BLE Δep::LUC NEO RDNA::ZFP3 (RNAi Ti) PAC</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	Klone 3, 5
<b>Herstellungsdatum</b>	10/2007
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pHD449; pGAPRONE WT.Luc; pHD615 ZFP3 Puro
<b>Selektionsdroge</b>	Bleomycin [1 µg/ml]; G418 [2 µg/ml]; Puromycin [0,15 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	vollständige <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdopplungszeit</b>	6-7 h
<b>Name</b>	<b>MITat 1.4 pHD449 ΔLII.Luc pHD615 ZFP3 Puro</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>RDNA::TETR BLE Δep::LUC (Δep1 3'UTR 101-172) NEO RDNA::ZFP3 (RNAi Ti) PAC</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	Klone 3, 7
<b>Herstellungsdatum</b>	11/2007
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pHD449; pGAPRONE ΔLII.Luc; pHD615 ZFP3 Puro
<b>Selektionsdroge</b>	Bleomycin [1 µg/ml]; G418 [2 µg/ml]; Puromycin [0,15 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	Deletion von nt 101-172 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdopplungszeit</b>	6-7 h

<b>Name</b>	<b>MITat 1.4 pHD449 WT.Luc pHD615 Tb927.4.4520 Puro</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>RDNA::TETR BLE Δep::LUC (Δep1 3'UTR 101-172) NEO RDNA::Tb927.4.4520 (RNAi Ti) PAC</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	07/2007
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pHD449; pGAPRONE WT.Luc; pHD615 Tb927.4.4520
<b>Selektionsdroge</b>	Bleomycin [1 µg/ml]; G418 [2 µg/ml]; Puromycin [0,15 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	vollständige <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdopplungszeit</b>	6-7 h
<b>Name</b>	<b>MITat 1.4 pHD449 WT.Luc pHD615 Tb927.8.7820 Puro</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>RDNA::TETR BLE Δep::LUC (Δep1 3'UTR 101-172) NEO RDNA::Tb927.8.7820 (RNAi Ti) PAC</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 1
<b>Herstellungsdatum</b>	07/2007
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pHD449; pGAPRONE WT.Luc; pHD615 Tb927.8.7820
<b>Selektionsdroge</b>	Bleomycin [1 µg/ml]; G418 [2 µg/ml]; Puromycin [0,15 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	vollständige <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdopplungszeit</b>	6-7 h
<b>Name</b>	<b>MITat 1.4 pHD449 WT.Luc pHD615 Tb11.02.5770 Puro</b>
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Genotyp</b>	<i>RDNA::TETR BLE Δep::LUC (Δep1 3'UTR 101-172) NEO RDNA::Tb11.02.5770 (RNAi Ti) PAC</i>
<b>Klon bzw. Pool</b>	Pool 2
<b>Herstellungsdatum</b>	07/2007
<b>Enthält Konstrukt(e)</b>	pHD449; pGAPRONE WT.Luc; pHD615 Tb11.02.5770
<b>Selektionsdroge</b>	Bleomycin [1 µg/ml]; G418 [2 µg/ml]; Puromycin [0,15 µg/ml]
<b>Bemerkung</b>	vollständige <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdopplungszeit</b>	6-7 h

### 2.1.3 Antikörper

	Name	Typ	Extinktion/ Emission (nm)	Referenz	Western Blot	Immun- fluoreszenz	FACS
Primär- antikörper	Kaninchen anti VSG 221 (MITat 1.2)	polyklonal		Ferguson et al. 1986		1:200	
	Kaninchen anti VSG 117 (MITat 1.4)	polyklonal		Ferguson et al. 1986		1:500	
	Kaninchen anti-PKAR 9430	polyklonal		Schulte zu Sodingen 2000	1:500		
	Maus anti PFR A/C L13D6	monoklonal		Kohl et al. 1999	1:2000		
	Maus anti <i>T. brucei</i> procyclin (Klon TBRP1/247) IgG	monoklonal (Actites)		Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby (Canada) (CLP001A)		1:500 bis 1:1000	1:500
	Kaninchen anti <i>TbZFP3</i>	Peptid-AK		Paterou et al. 2006	1:500		
Sekundär- antikörper	Alexa Fluor 488 Ziege anti Maus IgM Konjugat		495/519	Invitrogen, Karlsruhe (A21042)			1:2000
	Alexa Fluor 680 Ziege anti Kaninchen IgG (H+L) Konjugat		679/702	Invitrogen, Karlsruhe (A21076)	1:5000		
	IRDye 800 Ziege anti Maus IgG (H+L) Konjugat		778/806	Biomol, Hamburg (610-132-121)	1:5000		

### 2.1.4 Plasmide

#### Luciferase Reporter Konstrukte

<b>Name</b>	<b>pGAPRONE WT.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	pGAPRONE ΔLII.Luc wurde mit NdeI/NotI oder Eco31I/NotI verdaut und die 5714 bp und 2155 bp Fragmente direkt mit dem 117 bp Fragment aus dem Eco31I/NdeI Verdau von pPARP.cds.clo.ble in BKSII ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	09/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Panzer unter Anleitung von M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	enthält komplette <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>NEO</i>
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE WT.Luc BLE</b>
<b>Konstruktion</b>	pG(ble) wurde verdaut mit NheI/NotI und das 1056 bp Fragment mit dem 6583 bp Fragment des ebenfalls NheI/NotI verdauten Vektor pGAPRONE WT.Luc ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	05/2008
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	enthält komplette <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>BLE</i>

<b>Name</b>	<b>pGAPRONE inv 208-217.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	Die 5158 bp und 2072 bp Fragmente aus HindIII/NheI or Eco31I/HindIII verdautem pGAPRONE WT.Luc wurden direkt mit dem 755 bp Fragment aus dem Eco31I/NheI Verdau von pGAPRONE $\Delta$ II inv 208-217.Luc ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	12/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Inversion von nt 208-217 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>1-49.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	Das 895 bp Fragment aus einem NheI/XmnI Verdau von pGAPRONE WT.Luc wurde mit dem BamHI/Klenow/NheI behandelten pGAPRONE WT3'UTR.Luc Rückgrat (7038 bp) ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	12/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 1-49 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>1-49 inv 208-217.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	pGAPRONE $\Delta$ 1-49.Luc wurde mit Eco31I/HindIII geschnitten und das 2022 bp Fragment direkt mit den in der Konstruktion von pGAPRONE inv 208-217.Luc beschriebenen 755 bp und 5158 bp Fragmenten ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	12/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 1-49 und Inversion der nt 208-217 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>1-75.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	pGAPRONE WT3'UTR wurde mit BamHI/NdeI verdaut, mit Klenow behandelt und mit HindIII verdaut. Die 1877 bp und 6027 bp Fragmente wurden ohne das 80 bp Stück ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	12/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 1-75 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>1-173.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	siehe Diplomarbeit M. Brenndörfer
<b>Datum der Konstruktion</b>	10/2003
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 1-173 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>1-192.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	siehe Diplomarbeit M. Brenndörfer
<b>Datum der Konstruktion</b>	10/2003
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 1-192 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>LIV.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	pGAPRONE $\Delta$ LIV.Luc wurde mit BsaI/NheI verdaut und das 725 bp Fragment direkt mit den HindIII/NheI (5158 bp) and BsaI/HindIII (2072 bp) verdauten Fragmenten von pGAPRONE WT.Luc ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	10/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Panzer unter Anleitung von M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 267-297 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>1-49+LIV.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	pGAPRONE $\Delta$ LIV.Luc wurde mit NdeI/NheI verdaut und das 840 bp Fragment in das 7065 bp Rückgrat eines NdeI/NheI verdauten pGAPRONE $\Delta$ 1-49.Luc integriert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	12/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 1-49 und 268-297 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO

<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>176-297.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	Analog zu pGAPRONE $\Delta$ 174-247.Luc aber das lower PCR Produkt (713 bp) wurde mit den Primern del174-247_up und @CSD LowerPCR L1(3855) amplifiziert. pGAPRONE $\Delta$ LII.Luc diente hierbei als Vorlage.
<b>Datum der Konstruktion</b>	12/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 176-297 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>1-49+174-247.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	pGAPRONE $\Delta$ 174-247.Luc wurde mit NdeI/NheI verdaut und das 795 bp Fragment in das 7065 bp Fragment eines NdeI/NheI verdauten pGAPRONE $\Delta$ 1-49.Luc integriert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	12/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 1-49 sowie 174-247 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>174-247.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	Upper- (460 bp) und lower (764 bp) PCR Produkte von pGAPRONE WT3'UTR.Luc mit den Primern CSD Punktmut.U1(2702) und LIII up PCR low, bzw. LIII low PCR up und @CSD Lower PCR L1(3855) wurden mit BsaI verdaut, ligiert und dienten als Vorlage für eine zweite PCR mit den distalen Primern. Das 1197 bp Amplicon wurde mit BamHI/NheI verdaut und mit dem BamHI/NheI verdauten pGAPRONE WT3'UTR Rückgrat (7035 bp) ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	12/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 174-247 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>LII.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	siehe Furger et al. 1997
<b>Datum der Konstruktion</b>	unbekannt
<b>Hergestellt von</b>	erhalten von M. Engstler (genannt pG-luc-old )
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 101-172 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>LII inv 208-212.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	siehe Diplomarbeit M. Brenndörfer
<b>Datum der Konstruktion</b>	05/2003
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 101-172 sowie Inversion von nt 208-212 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>LII inv 208-217.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	siehe Diplomarbeit M. Brenndörfer
<b>Datum der Konstruktion</b>	06/2003
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 101-172 sowie Inversion von nt 208-217 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>LII inv 210-215.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	siehe Diplomarbeit M. Brenndörfer
<b>Datum der Konstruktion</b>	05/2003
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 101-172 sowie Inversion von nt 210-215 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>LII inv 213-217.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	siehe Diplomarbeit M. Brenndörfer
<b>Datum der Konstruktion</b>	05/2003
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 101-172 sowie Inversion von nt 213-217 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO

<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>LII m 185-187.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	siehe Diplomarbeit M. Brenndörfer
<b>Datum der Konstruktion</b>	10/2003
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 101-172 und Punktmutation der nt 185-187 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>NEO</i>
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>LII+III.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	Das 739 bp Amplicon einer PCR mit den Primern $\Delta$ LIII U1(3166) und @CSD Lower PCR L1(3855) von pGAPRONE $\Delta$ LII.Luc wurde mit EcoRV/NheI verdaut und das 681 bp Fragment daraus in das EcoRV/NheI Verdauende pGap(neo).PKAR5'1c.YFP Rückgrat (6564 bp) ligiert. Dieses Zwischenprodukt wurde BamHI/HindIII verdaut und der ebenfalls BamHI/HindIII isolierte Luciferase ORF (1877 bp) aus pGAPRONE $\Delta$ LII.Luc in das 5947 bp Fragment ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	09/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Panzer unter Anleitung von M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 101-263 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>NEO</i>
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>LII+IV.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	Das 696 bp Amplicon der PCR von pGAPRONE $\Delta$ LII.Luc mit den Primern IGR_XbaI_U1_3199 und IGR_L1_3871 wurde mit XbaI verdaut und das 272 bp Fragment in das XbaI linearisierte und CIP behandelte pGAPRONE $\Delta$ LII+IV+IGR.PKAR5'1c.YFP Rückgrat (7038 bp) ligiert. Dieses Zwischenprodukt wurde BamHI/HindIII verdaut und der ebenfalls BamHI/HindIII isolierte Luciferase ORF (1877 bp) aus pGAPRONE $\Delta$ LII.Luc in das 6010 bp Fragment ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	05/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 101-172 sowie 268-297 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>NEO</i>
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>LII+IV+IGR.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	PCR Amplifikation von pGAPRONE $\Delta$ LII.Luc mit den Primern CSD Punktmut.U1(2702) und $\Delta$ LIV low2 und anschließender BamHI/XbaI Verdau ergab das 201 bp Fragment, dass mit dem 6837 bp Rückgrat aus einem BamHI/XbaI Verdauten pGap(neo).PKAR5'1c.YFP ligiert wurde. Dieses Zwischenprodukt wurde BamHI/HindIII verdaut und der ebenfalls BamHI/HindIII isolierte Luciferase ORF (1877 bp) aus pGAPRONE $\Delta$ LII.Luc in das 5739 bp Fragment ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	03/2005
<b>Hergestellt von</b>	J. Pepperl unter Anleitung von M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 101-172 und 268-297 der <i>EP1</i> 3'UTR und 1-274 der IGR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>NEO</i>
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE GPEET.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	Der <i>GPEET</i> Locus wurde von AnTat 1.1 gDNA mit den Primern GPEET up and EP1 Igas (Vassella et al. 2001) amplifiziert. Eine nested PCR mit den Primern GPEET nest up und EP1 Igas fügt eine BamHI Erkennungsstelle ein. Nach Verdau dieses Amplicons mit AseI/ BamHI wird das 392 bp Fragment mit dem AseI/NotI verdauten pGAPRONE WT.Luc (5634 bp) ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	08/2006
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	<i>GPEET</i> 3'UTR anstelle der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>NEO</i>
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE HSP83.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	Das 6837 bp Fragment aus dem BamHI/XbaI Verdau von pGap(neo).PKAR5'1c.YFP wurde mit dem 860 bp Fragment des BamHI/XbaI Verdau von pHd1447 ligiert. Danach wurde der PKAR:YFP ORF (1299 bp) BamHI/HindIII durch den Luciferase ORF (1877 bp) ersetzt.
<b>Datum der Konstruktion</b>	07/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	<i>HSP83</i> 3'UTR anstelle der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>NEO</i>

<b>Name</b>	<b>pGAPRONE Ald.Luc</b>
<b>Konstruktion</b>	Das 333 bp Amplicon der PCR mit den Primern Ald3' U1 und Ald3' L1 von pLew20 als Vorlage wurde BamHI/XbaI verdaut (155 bp) und direkt mit dem in der Konstruktion von pGAPRONE $\Delta$ LII+IV.Luc beschriebenen IGR Fragment (272 bp) und dem BamHI/XbaI verdauten pGAPRONE $\Delta$ LII+IV.PKAR Zwischenprodukt (6837 bp) (siehe Konstruktion pGAPRONE $\Delta$ LII+IV.Luc) ligiert. Zuletzt wurde der PKAR:YFP ORF (1299 bp) BamHI/HindIII durch den Luc ORF (1877 bp) aus pGAPRONE $\Delta$ LII.luc ersetzt.
<b>Datum der Konstruktion</b>	07/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	trunkierte <i>Aldolase</i> 3'UTR (nt 1-177) anstelle <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE WT.Luc+</b>
<b>Konstruktion</b>	Das 1693 bp Fragment aus der Klonierung von pGAPRONE $\Delta$ 1-173.Luc+ wurde mit dem BamHI/HindIII verdauten pGAPRONE WT.Luc Vektor Rückgrat (6107 bp) ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	09/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Panzer unter Anleitung von M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	enthält komplette <i>EP1</i> 3'UTR, Luc+ Reporter aus Promega pGL3 Vektor
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>1-173.Luc+</b>
<b>Konstruktion</b>	Das Luc+ Reportergen wurde BamHI/HindIII aus pGAPRONE $\Delta$ LII.Luc+ isoliert (1693 bp) und in das ebenfalls BamHI/HindIII verdaute pGAPRONE $\Delta$ 1-173.Luc verdaute Vektor Rückgrat (5946 bp) kloniert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	10/2004
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 1-173 der <i>EP1</i> 3'UTR, Luc+ Reporter aus Promega pGL3 Vektor
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>LIV.Luc+</b>
<b>Konstruktion</b>	Das 1693 bp Fragment aus der Klonierung von pGAPRONE $\Delta$ 1-173.Luc+ wurde mit dem BamHI/HindIII verdauten pGAPRONE $\Delta$ LIV.Luc Vektor Rückgrat (6078 bp) ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	10/2005
<b>Hergestellt von</b>	M. Panzer unter Anleitung von M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 267-297 der <i>EP1</i> 3'UTR, Luc+ Reporter aus Promega pGL3 Vektor
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>LII.Luc+</b>
<b>Konstruktion</b>	pGL3 Control Vector (Promega) wurde XbaI verdaut, die Enden mit Klenow Fragment aufgefüllt und mit HindIII geschnitten. Das so erhaltene 1689 bp Fragment wurde in das BamHI linearisierte, mit Klenow Fragment behandelte und anschließend HindIII verdaute pGAPRONE $\Delta$ LII.Luc Vektor Rückgrat (6043 bp) ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	09/2004
<b>Hergestellt von</b>	M Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 101-172 der <i>EP1</i> 3'UTR, Luc+ Reporter aus Promega pGL3 Vektor
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Sonstige Reporter Konstrukte</b>	
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE WT.EP</b>
<b>Konstruktion</b>	Wie pGAPRONE $\Delta$ LII.EP außer, dass hier ein BamHI/HindIII verdauter pGAPRONE WT.Luc Vektor als Rückgrat verwendet wurde.
<b>Datum der Konstruktion</b>	07/2007
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	vollständige <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE <math>\Delta</math>LII.EP</b>
<b>Konstruktion</b>	Der <i>EP1</i> Locus (3747 bp) wurde von AnTat 1.1 PCF gDNA mit den Primern <i>EP1</i> locus up und -low amplifiziert. Das nun mit den Primern <i>EP1</i> ORF up and -low hergestellte 446 bp nested Amplicon wurde mit BamHI/HindIII verdaut und mit dem 6039 bp Fragment des ebenfalls BamHI/HindIII verdauten pGAPRONE $\Delta$ LII.Luc ligiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	07/2007
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 101-172 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	NEO

<b>Name</b>	<b>pGAPRONE ΔLII.EP:EGFP</b>
<b>Konstruktion</b>	siehe Engstler & Boshart 2004
<b>Datum der Konstruktion</b>	03/1999
<b>Hergestellt von</b>	M. Engstler
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 101-172 der <i>EP1</i> 3'UTR
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>NEO</i>
<b>Name</b>	<b>pGAPRONE (neo).PKAR5'1c.YFP</b>
<b>Konstruktion</b>	Luciferase ORF (BamHI/HindIII) von pGAPRONE ΔLII.Luc wurde durch PKAR::YFP ORF (BamHI/HindIII) ersetzt.
<b>Datum der Konstruktion</b>	unbekannt
<b>Hergestellt von</b>	C. Krumbholz
<b>Kurzbeschreibung</b>	Deletion von nt 101-172 sowie Inversion der nt 208-212 der <i>EP1</i> 3'UTR; z.T. als Zwischenstufe für Klonierungen benutzt wenn störende Restriktionsschnittstellen im Luciferase ORF ein direktes Klonieren verhinderten.
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	KpnI, NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>NEO</i>
<b>RNAi Konstrukte</b>	
<b>Name</b>	<b>pHD615 Tb927.4.4520</b>
<b>Konstruktion</b>	Sense (225 bp) und Antisense (286 bp) Fragmente für die RNAi Haarnadel wurden von MITat 1.4 gDNA mit den Primern Tb927.4.4520 5S und Tb927.4.4520 3S bzw. Tb927.4.4520 5AS und Tb927.4.4520 3AS amplifiziert. Die Fragmente der anschließenden Verdau mit HindIII/XhoI (Sense, 211 bp) bzw. BamHI/XhoI (Antisense, 272 bp) wurden direkt mit dem BamHI/HindIII verdauten pHD615 Puro Rückarat (5436 bp) ligationiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	07/2007
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Tet induzierbarer Expressionsvektor mit Haarnadel RNAi Konstrukt gegen Tb927.4.4520
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>PAC</i>
<b>Name</b>	<b>pHD615 Tb11.02.5770</b>
<b>Konstruktion</b>	Sense (228 bp) und Antisense (289 bp) Fragmente für die RNAi Haarnadel wurden von MITat 1.4 gDNA mit den Primern Tb11.02.5770 5S und Tb11.02.5770 3S bzw. Tb11.02.5770 5AS und Tb11.02.5770 3AS amplifiziert. Die Fragmente der anschließenden Verdau mit HindIII/XhoI (Sense, 214 bp) bzw. BamHI/XhoI (Antisense, 275 bp) wurden direkt mit dem BamHI/HindIII verdauten pHD615 Puro Rückarat (5436 bp) ligationiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	07/2007
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Tet induzierbarer Expressionsvektor mit Haarnadel RNAi Konstrukt gegen Tb11.02.5770
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>PAC</i>
<b>Name</b>	<b>pHD615 Tb927.8.7820</b>
<b>Konstruktion</b>	Sense (329 bp) und Antisense (395 bp) Fragmente für die RNAi Haarnadel wurden von MITat 1.4 gDNA mit den Primern Tb927.8.7820 5S und Tb927.8.7820 3S bzw. Tb927.8.7820 5AS und Tb927.8.7820 3AS amplifiziert. Die Fragmente der anschließenden Verdau mit HindIII/XhoI (Sense, 315 bp) bzw. BamHI/XhoI (Antisense, 386 bp) wurden direkt mit dem BamHI/HindIII verdauten pHD615 Puro Rückarat (5436 bp) ligationiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	07/2007
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Tet induzierbarer Expressionsvektor mit Haarnadel RNAi Konstrukt gegen Tb927.8.7820
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>PAC</i>
<b>Name</b>	<b>pHD615 ZFP3 Puro</b>
<b>Konstruktion</b>	Sense (338 bp) und Antisense (404 bp) Fragmente für die RNAi Haarnadel wurden von MITat 1.4 gDNA mit den Primern Tb927.3.720 5S und Tb927.3.720 3S bzw. Tb927.3.720 5AS und Tb927.3.720 3AS amplifiziert. Die Fragmente der anschließenden Verdau mit HindIII/XhoI (Sense, 319 bp) bzw. BamHI/XhoI (Antisense, 386 bp) wurden direkt mit dem BamHI/HindIII verdauten pHD615 Puro Rückarat (5436 bp) ligationiert.
<b>Datum der Konstruktion</b>	07/2007
<b>Hergestellt von</b>	M. Brenndörfer
<b>Kurzbeschreibung</b>	Tet induzierbarer Expressionsvektor mit Haarnadel RNAi Konstrukt gegen ZFP3
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>PAC</i>



<b>Standard-Vektoren</b>	
<b>Name</b>	<b>pBluescript II SK(-)</b>
<b>Konstruktion</b>	Genbank Accession no. X52330
<b>Datum der Konstruktion</b>	unbekannt
<b>Hergestellt von</b>	Stratagene, Heidelberg
<b>Kurzbeschreibung</b>	Standard Klonier Vektor
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	-
<b>Selektionsmarker</b>	-
<b>Name</b>	<b>pGL2 Control Vector</b>
<b>Konstruktion</b>	Genbank Accession No. X65324
<b>Datum der Konstruktion</b>	unbekannt
<b>Hergestellt von</b>	Promega, Mannheim
<b>Kurzbeschreibung</b>	Luciferase Reporter Vektor
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	-
<b>Selektionsmarker</b>	-
<b>Name</b>	<b>pGL3 Control Vector</b>
<b>Konstruktion</b>	Genbank Accession No. U47296
<b>Datum der Konstruktion</b>	unbekannt
<b>Hergestellt von</b>	Promega, Mannheim
<b>Kurzbeschreibung</b>	Luciferase+ Reporter Vektor
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	-
<b>Selektionsmarker</b>	-
<b>Name</b>	<b>pHD615 Puro</b>
<b>Konstruktion</b>	siehe Biebinger et al. 1997; <i>E. coli</i> Zitratsynthase eingefügt und <i>HYG</i> durch <i>PAC</i> ersetzt.
<b>Datum der Konstruktion</b>	unbekannt
<b>Hergestellt von</b>	B. Fast, modifiziert von M. Berenguer, erhalten von M. Kador
<b>Kurzbeschreibung</b>	Vektor für Tet induzierbare Expression
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>PAC</i>
<b>Name</b>	<b>pLew20</b>
<b>Konstruktion</b>	siehe Wirtz et al. 1999
<b>Datum der Konstruktion</b>	unbekannt
<b>Hergestellt von</b>	erhalten von M. Engstler
<b>Kurzbeschreibung</b>	Expressionsvektor
<b>Verdau(e) für Transfektion</b>	NotI
<b>Selektionsmarker</b>	<i>BLE</i>

## 2.1.5 Oligonukleotide

Die Synthese erfolgte bei MWG Biotech, Ebersberg oder Sigma Genosys, Taufkirchen. Nichtpaarende Nukleotide sind in den folgenden Tabellen durch kleine Lettern dargestellt, die Erkennungssequenzen verwendeter Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

### 2.1.5.1 Primer für Sequenzierungen

Name	Sequenz	Sequenzierung von	Bemerkung
M13FWD	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	pUC18 Derivaten	
M13REV	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	pUC18 Derivaten	
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AG	pBluescript Derivaten	
T7	AAT ACG ACT CAC TAT AG	pBluescript Derivaten	
EP1_3'UTR_SeqP	GTA ATT GTG GGT CAC TGT A	Mutationen in pGAPRONE sowie 3'RACE PCR	
EP1_3'UTR Low	AGG GCA GCG AAA CAA CT	3'UTR Mutationen in pGAPRONE	
pGAPRONE 5'SeqU1	TAG GGG TTA TTA GGT	3'UTR Mutationen in pGAPRONE	
VSG 221.U2.seq	TGA GCA AAG ACC CCA ACG	3'UTR Mutationen in pGAPRONE.PKAR	erhalten von M. Günzel
pDH615 Seq2	AGA GAT CCC TGA GTA CTG A	Haarnadel RNAi Sequenzen in pHD615	erhalten von M. Kador

## 2.1.5.2 Primer für reverse Transkription und RACE PCR

Name	Sequenz	Verwendung	Bemerkung
T17 AP	GAC TCG AGT CGA CAT CGA TTT TTT TTT TTT TTT TT	RACE PCR, RT PCR, XhoI Erkennungsstelle	erhalten von M. Kador
AP	GAC TCG AGT CGA CAT CG	RACE PCR, Adapter Primer, XhoI Erkennungsstelle	erhalten von M. Kador
EP1_3'UTR_SeqP	GTA ATT GTG GGT CAC TGT A	Sequenzierung 3' RACE PCR	
Long RACE_up	GGA TAT GGG CTC ACT GA	EP RACE PCR, längeres Amplicon	
EP-RACE nested	TCA CTG TAC TAT TTT AAC GAA	nested PCR für EP RACE PCR	
RACE Sonde U1742	CAA TTG CAC TGA TAA TGA ATT	Sonde for RACE PCR Southern	
RACE Sonde Low1	CTT GCA TCC GCG GAT C	Sonde for RACE PCR Southern	
LIV rev	AAG ATC CAA ATT CAA AGG AAT G	Sonde for RACE PCR Southern	
Oligo dT	TTT TTT TTT TTT TTT	RT PCR	

## 2.1.5.3 Primer und Hydrolysesonden für quantitative Real Time PCR

Name	Sequenz	Verwendung: qPCR Assay	Bemerkung
$\Delta$ LII low1	ACA GGG CTG TGG GTC TCA	$\Delta$ LII -spezifisch, SYBR green (nur für Optimierung)	
$\Delta$ LII Sonde2	TAA TAA GGC ATT GAT ATC AGG AAA C	$\Delta$ LII -spezifisch, SYBR green (nur für Optimierung)	
$\Delta$ LII up1	GAT GCA AGC GTG TAA AGC	$\Delta$ LII -spezifisch, SYBR green	
$\Delta$ LII Sonde FAM	ATG GTT AAT AAG GCA TTG ATA TCA G	$\Delta$ LII -spezifisch, SYBR green	FAM/Black hole Quencher 1
$\Delta$ LII Sonde1	ATG GTT AAT AAG GCA TTG ATA	$\Delta$ LII -spezifisch, SYBR green	
18S fwd	ACG GAA TGG CAC CAC AAG AC	18S -spezifisch, SYBR green	
18S rev	GTC CGT TGA CGG AAT CAA CC	18S -spezifisch, SYBR green	
Actin A fwd	GTA CCA CTG GCA TTG TTC TCG	Actin A -spezifisch, SYBR green	
Actin A rev	CTT CAT GAG ATA TTC CGT CAG	Actin A -spezifisch, SYBR green	
GAPDH fwd	AGA TTG ATG TCG TTG CTG TTG TG	GAPDH -spezifisch, SYBR green	
GAPDH rev	ATG GCT TGC TCT TCG TAG TCG	GAPDH -spezifisch, SYBR green	
Luc -as	AGT TTT CAC TGC ATA CGA CGA	LUC -spezifisch, SYBR green	
Luc F	GCC CTG GTT CCT GGA ACA A	LUC -spezifisch, SYBR green	
Luc_low2_1543	CGG TAC TTC GTC CAC AAA CAC	LUC -spezifisch, TaqMan	
Luc_up2_1351	CCC GCT GAA TTG GAA TCG ATA TGC TTT TAC AGA TGC ACA TAT	LUC -spezifisch, TaqMan	
LUC-TM	CGA GGT GAA CAT	LUC -spezifisch, TaqMan	FAM/Black berry Quencher
MRE11 fwd	ATT CAG CCG GGT AGT ACA ATC C	MRE11 -spezifisch, SYBR green	
MRE11 rev	GGG AAA TCC TGT GAC TCG ATA GG	MRE11 -spezifisch, SYBR green	
PFR2 fwd	GAA GTT GAA GGT GTT GTG AGT CC	PFR2 -spezifisch, SYBR green	
PFR2 rev	CCT CCA GCG TGA TAT CTG TTA CC	PFR2 -spezifisch, SYBR green	
TERT fwd	GAG CGT GTG ACT TCC GAA GG	TERT -spezifisch, SYBR green und TaqMan	
TERT rev	AGG AAC TGT CAC GGA GTT TGC	TERT -spezifisch, SYBR green und TaqMan	
TERT TaqMan	CGC TTA CGC CGC CAC TGT CAT CAC	TERT -spezifisch, TaqMan	TexRed/Black hole Quencher 2
Tub fwd	ACT GGG CAA AGG GCC ACT AC	Tubulin -spezifisch, SYBR green und TaqMan	
Tub rev	CTC CTT GCA GCA CAC ATC GA	Tubulin -spezifisch, SYBR green und TaqMan	
Tub TaqMan	CGG AGG GTG CGG AAC TGA TCG AC	Tubulin -spezifisch, TaqMan	TexRed/Black berry Quencher
Tub_low1_363	CAG TCA CAG CTC TCC GCC TCC	Tubulin -spezifisch, SYBR green	
Tub_up1_175	TAT GTG CCC CGC TCC GTG CTG	Tubulin -spezifisch, SYBR green	
ZFP3 qPCR low	CAC GAC CGC CAC GAT TCC	ZFP3 -spezifisch, SYBR green	
ZFP3 qPCR up	CCG CCT CCT CCT CCA GCA G	ZFP3 -spezifisch, SYBR green	

## 2.1.5.4 Primer für Klonierungen

Name	Sequenz	Klonierung von	Bemerkung
@CSD Lower PCR L1	CAA GCG GCC GGA GAA CCT GCG TGC AAT	m185-187 Mutation	
@CSD upper	CGC AAC Ctg cAC ATC ACA GAA	m185-187 Mutation, BspMI	
PCR_BspM1 L1	ATC TAC AG	Erkennungsstelle	
@CSD_TCC->CGT	TGA TGT gca GGT TGC GTA Tcg	m185-187 Mutation, BspMI	
BspM1 U1	tAT AAT TTT AAG CGT T	Erkennungsstelle	
16-mer Inv 1.H U1	CAT CGC CTG AGA CCC ACA GCt	16-mer Inversion (Mutation 208-212)	
(3098)	qtc cAG ATT TCT GTG ATG TT		
16-mer Inv 2.H U1	CAT CGC CTG AGA CCC ACA GCC	16-mer Inversion (Mutation 213-217)	
(3098)	CTG Ttt aqa TCT GTG ATG TT		
16-mer Inv U1 (3086)	CAT CGC CTG AGA CCC ACA Gct	16-mer Inversionen	
	taq atq tcc TCT GTG ATG TTT C		
16-mer Inv Z U1	CAT CGC CTG AGA CCC ACA GCC	16-mer Inversion (Mutation 210-215)	
(3098)	Caa atq tTT TCT GTG ATG TT		
Ald3'_L1(3149)	gag tct aga GAA TCC CCC CAT	trunkierte Aldolase 3'UTR, XbaI	
	TTT CTT C	Erkennungsstelle	
Ald3'_U1(2843)	GGC GGA AAG TCC AAA TTG TAA	trunkierte Aldolase 3'UTR	
CSD	AGT TGC GCG GAG GAG TTG TGT	m 185-187 Mutation	
Pnktmut.U1(2702)	TTG TG		
CSD_AAC-	tgt ggg tct cAG GCG ATG CAG	m 185-187 Mutation, Eco31I	
>CTG_Eco31I L1	AAT AAG	Erkennungsstelle	
dLIII U1 (3166)	cga cga taT CTA TTT TTT TTC	$\Delta$ LII Mutation, EcoRV	
	ATT CCT TTG	Erkennungsstelle	
dLIV low PCR.U1	TCA TaC CTg cGA ATc act ATC	$\Delta$ LII Mutation, BspMI	
(3185)	TTA AAA TTA TTA TTG GTG CCT	Erkennungsstelle	
	TGT G		
	TCA TaC Ctg cGA Atc acT ATC	LII+IV Mutation, BspMI u. BamHI	
dLIV low PCR.U2	TTA AAA TTA TTA TTG Gtg CCT	Erkennungsstelle	
	TGT G		
dLIV low2(3152)	cAg tct AGA AGT GAA ACG CTT	$\Delta$ LIV+IGR Mutation, XbaI	
	AAA ATT ATG G	Erkennungsstelle	
dLIV up PCR.L1	tga aac ctg cA GAA GTG AAA CGC	$\Delta$ LII Mutation, BspMI	
(3145)	TTA AAA TTA TGG AAT ACG C	Erkennungsstelle	
EP EGFP low	CGT AGG TCA GGG TGG TCA CGA G	Überprüfung der Integration pGAPRONE Derivaten	
EP1 3'UTR(BamHI).L1	TCC TGG ACC GCG CTG ATG AAC A	$\Delta$ 1-192 Mutation, ohne BamHI	
		Erkennungsstelle	
EP1 lgas	CCC AAA AGA AGA GAA GGC	GPEET, PCR aus genom. DNA	Vassella et al. 2001
EP1 locus low	CGA TGG CAA AGG TCA AGC	EP aus genom. DNA	
EP1 locus up	TCG TGT CCG ATA GGT ATC TCT T	EP aus genom. DNA	
EP1 ORF low	gat cGG ATC CTT AGA ATG CGG	EP aus genom. DNA, BamHI	
	CAA CGA G	Erkennungsstelle	
EP1 ORF up	act gaa gct tAT GGC ACC TCG	EP aus genom. DNA, HindIII	
	TTC CCT	Erkennungsstelle	
EP1_3'UTR195.U1	AaC gga tCC TGA GAC CCA CAG	$\Delta$ 1-192 Mutation, BamHI	
	CCC TG	Erkennungsstelle	
GPEET nest up	ctc gga tcc GCG GAT GCA AGC	GPEET aus genom. DNA, BamHI	
	GTG	Erkennungsstelle	
GPEET up	TTG CCG CGT AAC CCA	GPEET aus genom. DNA	
IGR_L1_3871	GAA CCT GCG TGC AAT CCA TCT TG	$\Delta$ LII+IV+IGR Mutation	
IGR_XbaI_U1_3199	gcg gtc tag AAA ATT ATT ATT	$\Delta$ LII+IV+IGR Mutation, XbaI	
	GGT GCC TTG TG	Erkennungsstelle	
Integr 5' up2	AGA ACC CGG TTG CCA TCC TTG A	Überprüfung der Integration pGAPRONE Derivaten	
LIII low PCR up	GTT GgG TcT cCt tTc tTT TTA	$\Delta$ 174-247 Mutation, BsaI	
	AGC GTT TCA CTT CTA	Erkennungsstelle	
LIII up PCR low	gTc AGG tct cAG AAA GGA TGT	$\Delta$ 174-247 Mutation, BsaI	
	CAC CAA A	Erkennungsstelle	
del174-297_up	ggg tgg tct cct ttc tAA AAT	$\Delta$ 176-297 Mutation, BsaI	
	TAT TAT TGG TGC CTT GTG TT	Erkennungsstelle	

Name	Sequenz	Klonierung von	Bemerkung
Neo upper MH	CGG TCT TGT CGA TCA GGA TG	Integration von pGAPRONE	erhalten von M.
pG 5' up	ACG GCA AAA GCT CAT TGG GAG TT	Derivaten	Hahn
Tb927.3.720 3AS	atg cag gga tcc TTG CAG TAA	Integration von pGAPRONE	
Tb927.3.720 3S	ATC CGC CTC	Derivaten	
Tb927.3.720 5AS	tcc gac act cga gCG TAA TTC	RNAi anti-sense Fragment,	
Tb927.3.720 5S	ACC AGG CCC ATG C	BamHI Erkennungsstelle	
Tb927.3.720 5S	aat aac ctc gag TTA TGC CAT	RNAi sense Fragment, XhoI	
Tb11.02.5770 3AS	GGG CGG AAC	Erkennungsstelle	
Tb11.02.5770 3S	atg cag aag ctt TTG CAG TAA	RNAi anti-sense Fragment, XhoI	
Tb11.02.5770 5AS	ATC CGC CTC	RNAi sense Fragment, HindIII	
Tb11.02.5770 5S	gag act cga gAT TCT CGG CAC	Erkennungsstelle	
Tb927.4.4520 3AS	GCG TGC	RNAi anti-sense Fragment,	
Tb927.4.4520 3S	acg caa gct tAA GAA CTA TTA	BamHI Erkennungsstelle	
Tb927.4.4520 5AS	AGT AAC	RNAi sense Fragment, XhoI	
Tb927.4.4520 5S	acg cgg atc cAA GAA CTA TTA	Erkennungsstelle	
Tb927.8.7820 3AS	AGT AAC	RNAi anti-sense Fragment, XhoI	
Tb927.8.7820 3S	ctg tct cga gGT TAG TGC ACG	Erkennungsstelle	
Tb927.8.7820 5AS	AAA GCC	RNAi sense Fragment, HindIII	
Tb927.8.7820 5S	gat gct cga gTG AAT GAG AGG	Erkennungsstelle	
Tb927.8.7820 5S	TTG TGG	RNAi anti-sense Fragment,	
Tb927.8.7820 5S	tgt taa gct tTG GCT ACG ATG	BamHI Erkennungsstelle	
Tb927.8.7820 5S	CTG AAG	RNAi sense Fragment, XhoI	
Tb927.8.7820 5S	tgt tgg atc cTG GCT ACG ATG	Erkennungsstelle	
Tb927.8.7820 5S	CTG AAG	RNAi anti-sense Fragment, XhoI	
Tb927.8.7820 5S	gcc act cga gAC CGT TGA TAT	Erkennungsstelle	
Tb927.8.7820 5S	CTC TTC	RNAi sense Fragment, HindIII	
Tb927.8.7820 5S	tca tct cga gTC AAA TCC ACC	Erkennungsstelle	
Tb927.8.7820 5S	AAA GAG	RNAi anti-sense Fragment,	
Tb927.8.7820 5S	ata gaa gct tTG GCG TTA CGG	BamHI Erkennungsstelle	
Tb927.8.7820 5S	AGC ATG A	RNAi sense Fragment, XhoI	
Tb927.8.7820 5S	ata ggg atc cTG GCG TTA CGG	Erkennungsstelle	
Tb927.8.7820 5S	AGC ATG A	RNAi anti-sense Fragment, XhoI	
Tb927.8.7820 5S	agc act cga gGA TGT CAG TTC	Erkennungsstelle	
Tb927.8.7820 5S	GGC TTC	RNAi sense Fragment, HindIII	
Tb927.8.7820 5S		Erkennungsstelle	

### 2.1.6 Enzyme

Antarctic Phosphatase	NEB, Frankfurt
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)	NEB, Frankfurt
DNase (RNase frei)	Applichem, Darmstadt
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
Klenow Fragment der DNA-Polymerase I	NEB, Frankfurt
Phusion DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon Rot
	NEB, Frankfurt
SuperScript II und III reverse Transkriptasen	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt

**2.1.7 Antibiotika**

Ampicillin	Stock: 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	Boehringer, Mannheim
Neomycin (G418)	Stock: 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	Sigma, Taufkirchen
Hygromycin	Stock: 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	Calbiochem, Darmstadt
Kanamycin	Stock: 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Phleomycin	Stock: 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	Cayla, Toulouse
Puromycin	Stock: 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	Sigma, Taufkirchen
Tetrazyklin	Stock: 10 mg/ml in EtOH	Sigma, Taufkirchen

**2.1.8 Chemikalien**

Agarosen	Biozym, Hess. Oldendorf
Aminosäuren	Applichem, Darmstadt
	Sigma, Taufkirchen
Ampholyte-Mix (Biolyte)	Bio-Rad, München
Dialysiertes FBS (Cat. No. A15-107)	PAA, Pasching (Österreich)
Dipyridamol	Sigma, Taufkirchen
Luciferin	PJK, Kleinblittersdorf
Organische Lösungsmittel	Roth, Karlsruhe
	Applichem, Darmstadt
	Merck, Darmstadt
Pepstatin A	Serva, Heidelberg
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma, Taufkirchen
Protease Inhibitor Complete Mini EDTA-free	Roche, Mannheim
RNasin RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
Rotiszint eco Plus LSC Cocktail	Roth, Karlsruhe
Säuren und Laugen	Roth, Karlsruhe
	Applichem, Darmstadt
Standard- und Feinchemikalien	Applichem, Darmstadt
	Merck, Darmstadt
	Roche, Mannheim
	Roth, Karlsruhe
	Sigma, Taufkirchen
Zusätze für Zellkulturmedien	Applichem, Darmstadt
	Invitrogen, Karlsruhe
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP	GE Healthcare, München
	Hartmann Analytic Braunschweig
$^{32}\text{P}$ (Orthophosphat) („carrier free“)	Hartmann Analytic Braunschweig

**2.1.9 Medien und Puffer**

HMI9	(Hirumi und Hirumi 1989) modifiziert nach Vassella und Boshart (1996): Iscove's Modified Medium Pulver für 1 l; 3,024 g NaHCO <sub>3</sub> ; 136 mg Hypoxanthin; 28,2 mg Bathocuproinsulfonat; 0,2 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 39 mg Thymidin; 100000 U Penicillin; 100 mg Streptomycin; 182 mg Cystein; 10% (v/v) FBS
Phosphatfreies HMI9	Für Markierungsexperimente wurden die Komponenten separat eingewogen. Die Zusammensetzung ist im Anhang aufgelistet (siehe 6.6). Komplementation wie HMI9, jedoch mit dialysiertem FBS.
SDM79	SDM79 wurde mit folgenden Modifikationen gegenüber Brun und Schonenberger (1979) hergestellt: keine p-Aminobenzoessäure; kein Biotin; statt Folsäure 10 ml MEM Vitamin Lösung (100x, Invitrogen); 10 mM Glycerin; 100000 U Penicillin (alle Angaben für 1 l Medium)
Konditioniertes SDM79	wurde gewonnen, indem eine logarithmisch wachsende AnTat 1.1 PCF WT Kultur bei einer Dichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml zentrifugiert (10 min; 900 g; 4 °C) und der Überstand nach Sterilfiltration (Porengröße 0,22 $\mu$ m) aliquotiert wurde
<i>T. brucei</i> Einfriermedien	HMI9 (BSF) oder SDM79 (PCF) wurde mit 10% (v/v) Glycerin versetzt und sterilfiltriert (Porengröße 0,22 $\mu$ m)
DTM	Basiert auf Medium B (Brun et al. 1981), modifiziert nach Czichos et al. (1986), Ziegelbauer et al. (1990) bzw. Vassella und Boshart (1996); Rezept für 1 l: 6,8 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,265 g CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O; 0,14 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O; 0,2 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 7,94 g HEPES; 1 ml Phenolrot (10 mg/ml); 20 ml MEM Aminosäure-Lösung (50x); 10 ml MEM nichtessentielle Aminosäurelösung (100x); 10 ml MEM Vitaminlösung (100x); 1,63 g L-Glutamin; 0,235 g Glutaminsäure; 730 $\mu$ l Glycerin; 1 mg Biotin; 633 mg Prolin; 110 mg Natriumpyruvat; 15% (v/v) FBS; 100000 U Penicillin; 100 mg Streptomycin; 182 mg Cystein; 28,2 mg Bathocuproinsulfonat; 3,75 mg Hämin; 136 mg Hypoxanthin
Cytomix	10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,6; 25 mM HEPES; 2 mM EGTA; 120 mM KCl; 150 $\mu$ M CaCl <sub>2</sub> ; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,5% (w/v) Glukose; 1 mM Hypoxanthin; 100 $\mu$ g/ml BSA
TDB	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,7; 5 mM KCl; 80 mM NaCl; 1 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM Glukose
PBS	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl

Polysomen Puffer	20 mM Tris pH 7,5; 120 mM KCl; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM DTT; 10 µg/ml Leupeptin; 100 µg/ml Cyclohexamid
Luc Assay Reagenz	20 mM Tris-HCl pH 7,8; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 mM EDTA; 33,3 mM DTT; 270 µM Coenzym A; 470 µM D-Luciferin; 530 µM ATP
Lysepuffer	250 mM Tris-HCl pH 7,8; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,2% (w/v) Saponin
LB-Medium	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; pH 7 (für 1 l Medium)
LB-Agarplatten	LB-Medium mit 16 g/l Agar
SOB-Medium	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; pH 7
<i>E. coli</i> Einfriermedium	25 mM Tris-HCl pH 8; 65% (v/v) Glycerin; 100 mM MgSO <sub>4</sub>
CaCl <sub>2</sub> Lösung	10 mM Piperazine-N,N'-bis (2-hydroxypropanesulfonic acid) (PIPES) pH 7; 60 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% (v/v) Glycerin (sterilfiltriert, Porengröße 0,22 µm)
TAE	40 mM Tris-HCl pH 8; 40 mM NaOAc; 1 mM EDTA
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat; pH 7
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,6; 1 mM EDTA
DNA-Auftragspuffer	0,1 M EDTA pH 8; 0,5% (w/v) Bromphenolblau; 0,5% (w/v) Xylencyanolblau; 40% (w/v) Saccharose; oder: 0,4% (w/v) Orange G; 15% (w/v) Ficoll 400
DEPC H <sub>2</sub> O	bdH <sub>2</sub> O wurde über Nacht mit 0,1% (v/v) DEPC gerührt um RNasen zu inaktivieren und anschließend autoklaviert (DEPC zerfällt, in CO <sub>2</sub> und Ethanol)
50x RNA-Puffer	(0,5 M Natriumphosphat pH 6,9) 0,275 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,225 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
RNA-Färbelösung	50 mM NaOH; 1 µg/ml EtBr
RNA-Entfärbelösung	200 mM Natriumacetat pH 4
Glyoxal-Mix	105 µl DMSO; 30 µl Glyoxal [40% (w/v), deionisiert]; 4,2 µl 50x RNA-Puffer Deionisierung von Glyoxal: 25 ml 40% (w/v) Glyoxal mit 5 g Amberlite MB-150 mixed bed exchanger (Sigma) 10 min bei Raumtemperatur (RT) rühren und Überstand nach Zentrifugation aliquotieren.
100x Denhardt's	2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon; 2% (w/v) BSA; 2% Ficoll
Hybridisierungs-Mix	5x SSC pH 7; 5x Denhardt's; 0,5% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) Tetranatriumpyrophosphat; 100 mg/l Heparin (Natriumsalz) in DEPC H <sub>2</sub> O
PEI-Puffer	1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 3,5
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4% (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4% (w/v) SDS
Anodenpuffer	300 mM Tris pH 10,4; 20% (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris pH 7,6; 20% (v/v) Methanol; 40 mM ε-Aminocaprinsäure
Laemmli Laufpuffer	25 mM Tris-Base pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,192 M Glycin

6x Laemmli Auftragspuffer	350 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,28% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerin; 0,6 M DTT; 0,012% (w/v) Bromphenolblau; 0,6% (w/v) $\beta$ -Mercaptoethanol
IP Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM EGTA; 150 mM NaCl; frisch supplementiert mit: 1/100 Vol Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Sigma); 1/50 Vol Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor (Roche); 0,4% (v/v) Nonidet P40; 1/100 Vol 2% (w/v) Na-Deoxycholat
2D Lysepuffer	9 M Urea; 4% (w/v) CHAPS; 1% (w/v) DTT; 1% (v/v) Bio-Lyte 3/10 Ampholyte (Bio-Rad); frisch supplementiert mit: 1/62,5 Vol Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Sigma); 1/50 Vol Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor (Roche); 25 $\mu$ g/ml Pepstatin A
Äquilibrationpuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 M Urea; 30% (w/v) Glycerin, 5% (w/v) SDS; eine Spur Bromphenolblau [Puffer A zusätzlich 1% (w/v) DTT; Puffer B zusätzlich 4% (w/v) Iodoacetamid]
Fixierlösung für Silberfärbung	40% (v/v) Ethanol (tech.); 10% (v/v) Essigsäure
Sensibilisierungslösung	0,02% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
Silbernitrat-Lösung	0,2% (w/v) Silbernitrat; 0,02% (v/v) Formaldehyd (37%)
Entwickler	0,0005% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ; 3% (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0,05% (v/v) Formaldehyd (37%)
Stop-Lösung	0,5% (w/v) Glyzin

### 2.1.10 Kits

BigDye Terminator Mix v3.1	Applied Biosystems, Darmstadt
Human T Cell Nucleofector Kit T	Lonza, Köln
iCycler iQ Calibrator Solution Kit	Bio-Rad, München
iQ Supermix	Bio-Rad, München
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München
Jumpstart Taq Ready Mix for qPCR	Sigma, Taufkirchen
Megaprime DNA Labelling System	Amersham, München
NucleoBond PC100 & 500	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Tissue	Macherey-Nagel, Düren
peqGold RNAPure	Peqlab, Erlangen
Protein Assay	Bio-Rad, München
SYBR Green Jumpstart Taq Ready Mix	Sigma, Taufkirchen



**2.1.11 Geräte**

Amaya Nucleofector II	Lonza, Köln
Bioruptor	Diagenode, Lüttich (Belgien)
Brutschränke Forma Scientific 3121	Thermo Scientific, Dreieich
Heraeus BB6060	Thermo Scientific, Dreieich
Heraeus Cytoperm 8088	Thermo Scientific, Dreieich
Thermo Heracell 240	Thermo Scientific, Dreieich
CASY I Cell Analyzer (Modell TTC)	Schärfe System, Reutlingen
Durchlichtscanner HP ScanJet 4050	Hewlett-Packard, Böblingen
Electro Cell Manipulator 630	BTX, San Diego (USA)
Flüssigszintillationszähler LS 5000 TD	Beckman Instruments, München
Geldoc 2000	Bio-Rad, München
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Hybridisierungssofen MKII	MWG Biotech, Ebersberg
iCycler iQ Real Time PCR System	Bio-Rad, München
Löschgerät für Phosphor Speicherfolien	GE Healthcare, München
Kryostat Multitemp III	GE Healthcare, München
Luminometer LB 9501	Berthold, Pforzheim
Micropulser	Bio-Rad, München
Mikroskope (IM35, Axiovert, Axiophot2)	Zeiss, Jena
MyCycler	Bio-Rad, München
Protean IEF System	Bio-Rad, München
Robocycler Gradient 40	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
Spektralphotometer DU 640	Beckman Instruments, München
Spektralphotometer Nano Drop-1000	Peqlab, Erlangen
Stratalinker	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
Typhoon Trio Variable Mode Imager	GE Healthcare, München
UV Leuchttisch Chroma 48 (366 nm)	Laborgeräte Vetter, Wiesloch
Vakuumkonzentrator	Bachofer, Reutlingen
Zentrifugen Sorvall RC5C (GSA, SS34)	Thermo Scientific, Dreieich
Heraeus Varifuge 3.0R	Thermo Scientific, Dreieich
Heraeus Varifuge 3.2RS	Thermo Scientific, Dreieich
Rotixa/KS	Hettich, Tuttlingen
2K15 (Rotor 12145)	Sigma, Deisenhofen
5417R	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge (Rotor TLA-45)	Beckman Instruments, München

**2.1.12 Internetdienste**

DNA mfold3.2 (Zuker 2003) <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/dna-form1.cgi>

RNA mfold2.3 (Walter et al. 1994; Zuker 2003) <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1-2.3.cgi>

HMMER 2.3.2 (Eddy 1998) <http://hmmer.janelia.org/>

M-CHiPS (Fellenberg et al. 2002) <http://www.mchips.org/>

BLAST (Altschul et al. 1990) <http://ncbi.nlm.nih.gov/>

GeneDB (Hertz-Fowler et al. 2004) <http://www.genedb.org/>

Pfam (Finn et al. 2008) <http://pfam.sanger.ac.uk/>

SMART (Schultz et al. 1998; Letunic et al. 2004) <http://smart.embl-heidelberg.de/>

**2.1.13 Software**

4Peaks Mekentosj, Amsterdam (NED) <http://mekentosj.com/4peaks/>

Beacon Designer 6.0 Premier Biosoft, Calo Alto (USA)

ClustalX 2.0 (Larkin et al. 2007) <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/clustalw2/>

EndNote X2.0.1 Thomson Reuters, Carlsbad (USA)

EnzymeX Mekentosj, Amsterdam (NED) <http://mekentosj.com/enzymex/>

Gene Construction Kit 2.5 Textco, New Hampshire (USA)

geNorm v 3.4 (Vandesompele et al. 2002)  
<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>

LinRegPCR v11.1 (Ramakers et al. 2003; Ruijter et al. 2009)  
<http://www.gene-quantification.de/download.html#linregpcr>

iCycler iQ 3.1 Bio-Rad, München

iCycler iQ 5 Bio-Rad, München

Image Quant Mac v1.2 GE Healthcare, München

ImageJ 1.42k <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

Multi Analyst 1.0.2 Bio-Rad, München

Odyssey 2.1 LI-COR, Bad Homburg

Oligo 6.8 Molecular Biology Insights, Cascade (USA)

PDQuest Basic 8.0.1 Bio-Rad, München

Quantity One 4 Bio-Rad, München

Quick Term 1.01 <http://www.gelhaus.net/cgi-bin/page.py?loc:cocoa/+content:quickterm.html>

Tera Term Pro 2.3 <http://hp.vector.co.jp/authors/VA002416/teraterm.html/>

TextWrangler Bare Bones Software, Bedford (USA)  
<http://www.barebones.com/products/TextWrangler/>

Vector NTI Suite Invitrogen, Karlsruhe

VirtualBox 3.1.2 Sun Microsystems Inc. <http://www.sun.com/>

### 2.1.14 Sonstige Materialien

CO <sub>2</sub> Messgerät	Dräger, Lübeck
Dodeca Gel Färbekammer	Bio-Rad, München
Elektroporationsküvetten	BTX Disposable Cuvettes, 2 mm Bio-Rad Gene Pulser Cuvettes, 2 mm VWR Elektroporationsküvette, 2 mm
Hämozytometer Neubauer Improved	Brand Gläser, Wertheim
IPG-Streifen	Bio-Rad, München
Kammern für vertikale Agarosegel-Elektrophorese	Werkstatt LMU, München
Kammern für SDS-PAGE	Mini-Protean Tetra; Bio-Rad, München Protean Plus Dodeca; Bio-Rad, München
Membran Hybond N (Nylon)	GE Healthcare, München
Membran Immobilon-FL (PVDF)	Millipore, Eschborn
Optische PCR-Gefäße	Bio-Rad, München
Phosphor Speicherfolien	GE Healthcare, München
Polygram CEL 300 PEI Fertigfolien	Macherey-Nagel, Düren
Potter (Zellhomogenisator)	Leihgabe von C. Clayton, ZMBH Heidelberg
Standards (DNA, RNA, Protein)	Fermentas, St. Leon Rot NEB, Frankfurt
Sterilfiltereinheiten 0,2 µm (verschiedene)	Macherey-Nagel, Düren Millipore, Eschborn Schleicher & Schuell, Dassel
Stratacooler	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
Whatman 3 MM Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel

## 2.2 Methoden und Protokolle

### 2.2.1 Zellkultur von *Trypanosoma brucei*

#### 2.2.1.1 Kultur von monomorphen BSF

Monomorphe BSF wurden in HMI9 Medium bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Eine Dichte von  $8 \times 10^5$  Zellen/ml wurde nicht überschritten. Die Zelldichte wurde regelmäßig mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,02 mm oder 0,1 mm) ermittelt.

#### 2.2.1.2 Kultur von PCF

*T. brucei* PCF wurden in SDM79 Medium bei 27 °C kultiviert. Die Zelldichte von logarithmisch wachsenden Populationen wurde zwischen  $2 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,02 mm) oder mit dem CASY I-Zellanalysator regelmäßig bestimmt.

### 2.2.1.3 Kälteschockinduktion

Der Kälteschock erfolgte, falls nicht anders angegeben, durch Inkubation für 16 h bei 20 °C im Brutschrank, an dessen Kühlkreislauf das Multitemp III Kryostat angeschlossen wurde. Bei BSF wurde zusätzlich eine wassergesättigte Atmosphäre, sowie 5% CO<sub>2</sub> eingestellt.

### 2.2.1.4 Kryolagerung

Zum Einfrieren wurden  $4 \times 10^6$  BSF Zellen bzw.  $4 \times 10^7$  PCF Zellen aus dem Kulturmedium nach Sedimentieren (BSF: 1400 g; 10 min; 4 °C bzw. PCF: 900 g; 10 min; 4 °C) in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt und anschließend im Stratacooler über Nacht auf -80 °C abgekühlt. Die Langzeitlagerung der Stabilate erfolgte in flüssigem Stickstoff bzw. in einer -152 °C Truhe.

Die zügig im Wasserbad (BSF: 37 °C bzw. PCF: 27 °C) aufgetauten Trypanosomen wurden nach Waschen in 10 ml entsprechend vorgewärmtem Medium und anschließender Zentrifugation in 10 ml Medium resuspendiert. Nach Inkubation für 1 h, wurde ein Aliquot für die Zellzählung abgenommen, die Kultur ggf. verdünnt und wenn erforderlich mit dem geeigneten Antibiotikum selektioniert.

### 2.2.1.5 Stabile Transfektion monomorpher BSF

#### 2.2.1.5.1 Mit dem BTX Electro Cell Manipulator 630

Die Transfektion erfolgte in Anlehnung an die in Carruthers et al. (1993) beschriebene Elektroporationsmethode. Trypanosomen wurden zentrifugiert (1400 g; 10 min; 37 °C), das Pellet in 50 ml auf 37 °C vorgewärmtem Cytomix resuspendiert und erneut zentrifugiert. Für die nachfolgende Transfektion wurde das Pellet von  $1 \times 10^7$  Zellen in 400 µl Cytomix resuspendiert und in einer sterilen Küvette (BTX, Elektrodenabstand 2 mm) mit 10 µl linearisierter und steril gefällter Plasmid DNA (1 µg/µl in bdH<sub>2</sub>O) gemischt. Die Elektroporation erfolgte mit den Einstellungen: 1,5 kV; 25 µF; 175 Ω. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in 50 ml auf 37 °C vorgewärmtes HMI9 überführt. Üblicherweise wurden fünf parallele Transfektionen desselben Konstrukts durchgeführt. Nach Inkubation für 16-20 h erfolgte die Selektion für den, mit der Transfektion neu eingeführten Resistenzmarker. Erste Transfektanden waren etwa ab dem fünften Tag nach Selektionszugabe in der Zellkulturflasche zu erkennen.

#### 2.2.1.5.2 Mit dem Amaxa Nucleofector

Das seit 2007 in diesem Labor verfügbare Amaxa Gerät erhöht die Transformationseffizienz bei Trypanosomen drastisch (Burkard et al. 2007) und wurde für alle Experimente mit MITat 1.4 Zellen angewendet. Dieser Stamm weist mit der unter 2.2.1.5.1 beschriebenen Methode eine geringe Transformationseffizienz auf. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Labors von G. Cross (New York, USA) <http://tryps.rockefeller.edu/>:  $3\text{--}5 \times 10^6$  BSF Zellen wurden zentrifugiert (1400 g; 10 min; RT), das Pellet auf Eis in 100 µl Amaxa Puffer resuspendiert und anschließend in einer sterilen Küvette mit 10 µg linearisierter und steril gefällter Plasmid DNA (2 µg/µl in bdH<sub>2</sub>O) gemischt. Nach Transfektion mit dem Programm X-001 wurde die Suspension in 30 ml HMI9

resuspendiert und für klonale Populationen zusammen mit je einer 1:10, sowie 1:100 Verdünnung auf 24-Loch Platten ausplattiert. Aufgrund der höheren Effizienz erwies sich eine Transfektion pro Konstrukt als ausreichend. Die Selektion für den, mit der Transfektion neu eingeführten Resistenzmarker, erfolgte nach Inkubation für 6-12 h.

#### 2.2.1.6 Stabile Transfektion von PCF

$1 \times 10^7$  Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur wurden zentrifugiert (900 g; 10 min; 4 °C), das Pellet in 10 ml kaltem Cytomix resuspendiert und erneut zentrifugiert. Für die nachfolgende Transfektion wurde das Zellpellet in einer Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen pro 400 µl Cytomix resuspendiert und in einer sterilen Küvette (BTX, Elektrodenabstand 2 mm) mit 10 µl linearisierter und steril gefällter Plasmid DNA (1 µg/µl in  $\text{bdH}_2\text{O}$ ) gemischt. Die Elektroporation erfolgte mit dem BTX Electro Cell Manipulator 630 und den Einstellungen: 1,5 kV; 25 µF; 175 Ω. Anschließend wurden die Zellen sofort in 10 ml, 30% (v/v) konditioniertes SDM79 (27 °C) überführt und für klonale Populationen zusammen mit 1:10, sowie 1:100 Verdünnungen auf 96-Loch Platten ausplattiert. Aufgrund der höheren Effizienz ist bei PCF eine Transfektion pro Konstrukt ausreichend. Nach 16-20 h erfolgte die Selektion für den, mit der Transfektion neu eingeführten Resistenzmarker.

#### 2.2.1.7 RNA-Interferenz

Für die RNAi vermittelte Reduktion der Expression verschiedener Kandidatengene wurde das Haarnadel System verwendet, da hierbei die uninduzierte Expression („leakyness“) erfahrungsgemäß geringer ist, als bei dem alternativen System mit zwei entgegengläufigen T7 Promotoren. Dazu wurde zunächst das Luciferase Reporter Konstrukt (pGAPRONE WT.Luc) in die MITat 1.4 pHD449 Zelllinie (B. Fast dieses Labor, unpublizierte Daten) integriert, die den Tetrazyklin Repressor (TetR) konstitutiv exprimiert. Anschließend wurde das entsprechende Haarnadel RNAi-Konstrukt [Derivat von pHD615 (Biebinger et al. 1997) mit Puromycin Resistenzkassette] in diese Zelllinie transfiziert. Der TetR bindet in Abwesenheit von Tetrazyklin an den Tet Operator und verhindert die Expression des Haarnadel RNAi Fragments. Die Induktion mit 1 µg/ml Tet zum Kulturmedium dereprimiert den TetR. Somit ist der Prozyklin Promotor des Expressionsvektors pHD615 für die RNA Pol I zugänglich, was wiederum die starke Transkription des Haarnadel RNAi Fragments zur Folge hat.

#### 2.2.1.8 Metabolische Markierung mit $^{32}\text{P}$

*T. brucei* BSF bzw. wurden in phosphatfreiem HMI9 [komplementiert mit 10% dialysiertem FBS (PAA)] gewaschen und für 10-16 h in diesem Medium vorinkubiert, um intrazelluläre Phosphatspeicher zu depletieren. Nach Zentrifugation (1400 g; 10 min; 37 °C) wurden  $10^7$  Zellen in 500 µl phosphatfreiem Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 9,25-92,5 MBq/ml  $^{32}\text{P}$  (Orthophosphat) erfolgte die Markierungsreaktion unter leichtem Schütteln für 7,5-120 min bei 37 °C auf einem Thermomixer. Zur Optimierung wurden die Ansätze zunächst entsprechend verkleinert um die Kosten zu senken und um die Strahlenexposition zu minimieren. Nach Zentrifugation (1400 g; 5 min; 37 °C) wurde das Zellpellet zur Lyse in 250 µl IP Puffer für 15 min auf Eis inkubiert.

Die Präzipitation der Proteine erfolgte nach Zugabe von 1/10 Vol 100% (w/v) TCA für 1 h auf Eis. Das Proteinpellet (10000 g; 10 min; 4 °C) wurde zweimal mit eiskaltem 100% Aceton gewaschen (10000 g; 10 min; 4 °C), kurz an der Luft getrocknet und für 3 h bei RT unter mehrmaligem starken Vortexen in 2D Lysepuffer resuspendiert. Das Volumen richtete sich nach der Empfehlung für die aktive Rehydrierung der verwendeten IPG-Streifen.

Für Experimente mit Kälteschockinduktion wurde die Zentrifugation der Zellen bei 4 °C durchgeführt, während die uninduzierte Kontrolle analog bei 37 °C behandelt wurde. Die Aufnahme von  $^{32}\text{P}$  wurde durch Messung im Flüssigszintillationszähler (offener Kanal) verfolgt. Die Werte der zur Ermittlung des „Quenchings“ berechneten H#-Nummer (Horrocks 1978) lagen im Mittel bei 50 ( $\pm 1,8$ ). Demzufolge wurde zur Vereinfachung von einer Zähleffizienz von 100% ausgegangen.

## 2.2.2 *Escherichia coli* Methoden

### 2.2.2.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien

500 ml LB Medium wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C auf einem Schüttler bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 bis 0,6 inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis und Zentrifugation (4000 g; 15 min; 4 °C) wurde das Zellpellet auf Eis in 500 ml sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml 10% (v/v) Glycerinlösung resuspendiert, erneut sedimentiert (4000 g; 15 min; 4 °C) und auf Eis in 4 ml 10% (v/v) Glycerinlösung resuspendiert. Aliquots à 100  $\mu\text{l}$  der kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

500 ml LB Medium wurden mit 5 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 37 °C auf einem Schüttler bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,37 inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis und Zentrifugation (1600 g; 7 min; 4 °C; ohne Bremse) wurden die Bakterien auf Eis in 10 ml steriler  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und zentrifugiert (1100 g; 5 min; 4 °C; ohne Bremse). Das Pellet wurde erneut in 10 ml  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach weiterer Zentrifugation (1100 g; 5 min; 4 °C; ohne Bremse) wurde das Pellet in 2 ml  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und für 6 h auf Eis inkubiert. Aliquots der kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2.3 Elektroporation

Nach dem Auftauen auf Eis wurden 40  $\mu\text{l}$  elektrokompente Zellen und 1-2  $\mu\text{l}$  gefällte DNA (in  $\text{bdH}_2\text{O}$ ) aus einem Ligationsansatz in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Nach einminütiger Inkubation folgte die Elektroporation in der Gene Pulser Apparatur mit dem Programm EC2 (2,5 kV; 25  $\mu\text{F}$  und 200  $\Omega$ ). Danach wurden die Zellen unverzüglich in 1 ml SOB Medium resuspendiert und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in mehreren Verdünnungen auf LB-Amp Agar ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.2.4 Chemische Transformation

Nach dem Auftauen auf Eis wurden 100 µl chemisch kompetente Zellen und 5 µl DNA aus einem Ligationsansatz gemischt. Nach Inkubation auf Eis für 30 min wurde die Suspension 1 min bei 42 °C inkubiert und sofort danach 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen in 900 µl LB Medium resuspendiert und 40 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die in mehreren Verdünnungen auf LB-Amp Agar ausplattierten Zellen wurden dann ÜN bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.2.5 Langzeitlagerung

*E. coli* Stämme wurden in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C auf einem Schüttler ÜN angezogen, bevor je 1 ml der Kultur und *E. coli* Einfriermedium gemischt und bei -80 °C aufbewahrt wurde.

#### 2.2.2.6 Isolierung von Plasmid DNA

Zur Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* wurden die NucleoSpin Plasmid, NucleoBond PC 100 oder NucleoBond PC 500 Kits von Macherey-Nagel entsprechend den Herstellerangaben (mit Filtrierung des Lysats) verwendet. Kleine DNA-Mengen wurden alternativ durch Mini-Präparationen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert (Birnboim und Doly 1979; Birnboim 1983).

### 2.2.3 Standard Kloniertechniken

#### 2.2.3.1 Enzymatische Behandlung von DNA

Restriktionsverdau und andere enzymatische Behandlungen wurden, soweit nicht anders angegeben, den Herstellerempfehlungen entsprechend durchgeführt.

#### 2.2.3.2 DNA-Amplifikation (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis und Faloona 1987) erfolgte mit Taq-, bzw. Phusion DNA-Polymerase, nach den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers. Die Primer wurden mit dem Programm Oligo 6.8 entworfen. Vor Weiterverarbeitung wurden die Reaktionsansätze durch Isopropanolfällung oder mit dem NucleoSpin Extract II Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt.

#### 2.2.3.3 Agarosegel-Elektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden in EtBr-haltigen (1 µg/ml) Agarosegelen [0,8-2% (w/v)] in TAE-Puffer bei ca. 5 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Zuvor wurden die Proben mit 0,1 Volumen 10x Auftragspuffer versetzt. Der Vergleich mit entsprechenden DNA-Standards ermöglichte die Größenzuordnung. Die Visualisierung der Banden erfolgte auf dem Geldokumentationssystem Geldoc 2000 für analytische Gele bzw. auf dem Chroma 48 UV-Leuchttisch bei langwelligem UV Licht für präparative Gele.

#### 2.2.3.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem NucleoSpin Extract II Kit von Macherey-Nagel, nach den Angaben des Herstellers.

### 2.2.3.5 Präzipitation von Nukleinsäuren

#### 2.2.3.5.1 Präzipitation von DNA mit Isopropanol

DNA-Lösungen wurden mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 7 und 1 Volumen Isopropanol gemischt, zentrifugiert (20000 g; 15 min; 4 °C) und das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Präzipitat am getrocknet und in bdH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer gelöst. DNA Pellets für Transfektionen in *T. brucei* wurden unter sterilen Bedingungen getrocknet. Die Konzentration der DNA wurde anschließend mit bdH<sub>2</sub>O auf 1 µg/µl eingestellt.

#### 2.2.3.5.2 Präzipitation von RNA mit Ethanol

RNA-Lösungen wurden nach Mischen mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol (100%) bei -20 °C für 1 h präzipitiert. Nach Zentrifugation (20000 g; 15 min; 4 °C) wurde das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol (RT) gewaschen und getrocknet, bevor es in RNase freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert wurde.

### 2.2.3.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurden durch Messung der Absorption bei Wellenlängen von 260 und 280 nm im Spektralphotometer bestimmt. Die definierten Konzentrationen bei einer OD<sub>260</sub> von 1 sind 50 µg/ml für dsDNA, 33 µg/ml für ssDNA und 40 µg/ml für RNA. Aus dem Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> lässt sich die Reinheit der Präparation abschätzen. Es liegt für dsDNA idealerweise bei 1,8 bzw. für RNA bei 2,0.

### 2.2.3.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte auf dem ABI 3730 Gerät beim hauseigenen Sequenzierservice mit dem BigDye v3.1 Mix und dem „Clean & Run“ Protokoll (<http://www.genetik.biologie.uni-muenchen.de/sequencing/>). Hierfür wurden jeweils 200 ng Plasmid DNA und 400 pmol Primer in die Reaktion eingesetzt. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit dem Programm 4Peaks.

## 2.2.4 Isolierung von Nukleinsäuren aus *T. brucei*

### 2.2.4.1 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA aus Trypanosomen wurde mit dem NucleoSpin Tissue-Kit von Macherey-Nagel isoliert. Nach Sedimentierung (BSF: 1400 g; 10 min; 4 °C bzw. PCF: 900 g; 10 min; 4 °C) logarithmisch wachsender Kulturen (Zelldichte BSF: 5-8x10<sup>5</sup> Zellen/ml bzw. PCF: 0,5-2x10<sup>7</sup> Zellen/ml) wurde die DNA-Isolierung gemäß den Herstellerangaben (Standard-Protokoll für kultivierbare Zellen ohne Prä-Lyse Schritt) durchgeführt.



### 2.2.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA

#### 2.2.4.2.1 Vorbereitungen für Arbeiten mit RNA

Um Kontaminationen mit RNasen vorzubeugen, wurden alle Arbeiten mit RNA mit Handschuhen durchgeführt. Glaswaren, Metallwannen, Spatel, Pinzetten u. ä. wurden für >3 h bei 180 °C gebacken. Gelkammern, Kämmen und andere Gebrauchsgegenstände, die dies nicht zulassen, wurden mit 1% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gereinigt und anschließend gründlich mit DEPC H<sub>2</sub>O gespült.

#### 2.2.4.2.2 Phenol-Methode

Die Isolierung größerer Mengen Gesamt-RNA aus Trypanosomen erfolgte mit dem peqGold RNAPure Reagenz, das auf der Methode zur Isolierung von RNA mit Guanidinisothiocyanat und Phenol basiert. Das Standardprotokoll wurde für die Verwendung mit Trypanosomen optimiert. Entsprechend dem in etwa zehnmal geringeren RNA-Gehalt gegenüber Säugerzellen, wurden abweichend vom Originalprotokoll  $5 \times 10^7$  Zellen durch Zentrifugation sedimentiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen im zurückbleibenden Medium resuspendiert, in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Nach quantitativer Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet gründlich in 1 ml peqGold RNAPure resuspendiert und ggf. bis zur gemeinsamen Bearbeitung mehrerer Proben bei -80 °C gelagert. Die weitere Durchführung entsprach den Herstellerangaben.

#### 2.2.4.2.3 Silika-Säulen Methode

Das Pellet von  $1-2 \times 10^7$  Trypanosomen wurde nach einem Waschschrift mit 1 ml sterilem PBS entsprechend dem Protokoll für Zellen in Suspensionskultur bearbeitet. Wenn mehrere Zeitpunkte bearbeitet werden sollten, wurde das Zelllysate zwischenzeitlich in Puffer RA1 ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol bei -80 °C eingefroren. Der optionale Verdau mit rekombinanter DNase wurde in allen Fällen durchgeführt. Die Ausbeute der RNA-Extraktion lag bei etwa 5  $\mu$ g RNA/ $10^7$  Zellen.

### 2.2.4.3 Isolierung von polysomenassoziiierter RNA

Die Isolierung erfolgte mit leichten Änderungen wie in Brems et al. (2005) beschrieben:  $2 \times 10^9$  BSF Zellen wurden mit 100  $\mu$ g/ml Cyclohexamid versetzt, um translatierende Ribosomen auf der mRNA zu arretieren, sedimentiert (2000 g; 5 min; 4 °C) und nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem Polysomen Puffer in 5 ml Polysomen Puffer mit 5  $\mu$ l RNasin (Promega) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis durch 15 langsame Hübe in einem Potter-Zellhomogenisator, wobei nach den ersten fünf Hüben 0,5% (v/v) NP-40 zugegeben wurde. Die Lyse der Zellen wurde im Lichtmikroskop überprüft. Der Überstand (4500 g; 10 min; 4 °C) des Lysats wurde in einer Ultrazentrifuge mit TLA-45 Rotor sedimentiert (72000 g; 35 min; 4 °C) und die Polysomenfraktion (Pellet) über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator in 6 ml peqGold RNAPure gelöst. Anschließend erfolgte die Verarbeitung nach Herstellerangaben. Die Ausbeute betrug etwa 40  $\mu$ g polysomenassoziierte RNA/ $10^9$  Zellen.

### 2.2.5 Vertikale Glyoxalgel-Elektrophorese von RNA

Zur Überprüfung von RNA-Extraktionen auf Degradation oder für Northern Blots wurde Gesamt-RNA in einem 2 mm dünnen, vertikalen Glyoxal Agarosegel [1,4% (v/v)], in Anlehnung an die Methode von McMaster und Carmichael (1977) aufgetrennt: 1,4 g Agarose wurden mit 98 ml DEPC H<sub>2</sub>O durch Erhitzen gelöst, im Wasserbad auf 50 °C abgekühlt und nach Mischen mit 2 ml 50x RNA-Puffer in eine vorbereitete Gelkassette aus Glas gegossen. Nach vollständigem Aushärten der Agarose wurde der Kamm vorsichtig entfernt, die Kassette in einer Vertikal-Gelkammer befestigt und die über eine Pumpe verbundenen Reservoirs mit 1x RNA-Puffer befüllt. 4 µl Gesamt-RNA wurden mit 7,2 µl Glyoxal-Mix gemischt und direkt nach Denaturierung (40 min; 50 °C) auf das Gel aufgetragen. Zur Visualisierung der Laufrichtung wurde ebenfalls eine Spur mit 4 µl 1% (w/v) Bromphenolblau mit 7,2 µl Glyoxal-Mix versetzt und aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter ständiger Laufpuffer-Zirkulation bei 90 V, bis das Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreicht hat (etwa 2 h).

### 2.2.6 Ethidiumbromidfärbung von RNA im Glyoxalgel

Zur Kontrolle von RNA Präparationen auf Degradation wurde 0,5-1 µg Gesamt-RNA elektrophoretisch wie in 2.2.5 beschrieben aufgetrennt und das 2 mm dünne Agarosegel anschließend auf einer Glasplatte liegend unter vorsichtigem Schwenken für 60 min in 400 ml RNA-Färbelösung inkubiert. Nach zweimaligem Schwenken für 15 min in RNA-Entfärbelösung wurde das Gel auf dem Geldoc 2000 fotografiert. Die Größenabschätzung erfolgte durch Vergleich mit einem RNA-Größenstandard (RNA Ladder, NEB oder RNA Ladder High Range, Fermentas).

### 2.2.7 Northern Blot

Northern Blots wurden durchgeführt wie in Carrington et al. (1987) beschrieben. Nach elektrophoretischer Auftrennung von 5 µg Gesamt-RNA im Glyoxal Agarosegel (2.2.5) und Kapillartransfer mit 20x SSC (ÜN) auf eine ungeladene Nylonmembran (Hybond N, GE Healthcare) wurde die RNA mit der „Autocross“ Funktion (120 mJ/cm<sup>2</sup>) im Stratalinker fixiert und für 1 h bei 80 °C zwischen zwei Whatman Papieren gebacken, um das Glyoxylat zu entfernen.

#### 2.2.7.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

DNA-Sonden wurden nach dem Prinzip der „random prime“ DNA-Synthese (Feinberg und Vogelstein 1983) mit dem Megaprime DNA Labelling System (GE Healthcare) hergestellt. Üblicherweise wurden die Reaktionsvolumina abweichend zum Standard-Herstellerprotokoll halbiert und dementsprechend nur 925 kBq [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP eingesetzt.

#### 2.2.7.2 Polyethylenimin Chromatographie

Die Polyethylenimin (PEI) Chromatographie diente der Kontrolle des Einbaus radioaktiv markierter Nukleotide in Oligonukleotide. 0,2 µl des markierten Sondenansatzes aus 2.2.7.1 wurden auf eine Polygram CEL 300 PEI Folie (Macherey-Nagel) aufgetragen und durch Dünnschichtchromatographie

in 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 3,5 aufgetrennt, bis die Laufront das Ende des Filters erreicht hatte. Nicht eingebaute Nukleotide wandern mit dem Laufpuffer, während Oligonukleotide am Auftragspunkt zurückbleiben. Der Filterstreifen wurde getrocknet und nach Anfertigung einer Autoradiographie kurz über dem Auftragspunkt zerschnitten. Der prozentuale Anteil der eingebauten Nukleotide wurde im Szintillationszähler bestimmt.

### 2.2.7.3 Hybridisierung

Nach Vorhybridisierung mit 5-10 ml Hybridisierungs-Mix für 1 h bei 65 °C, erfolgte die Inkubation im Hybridisierungssofen bei 65 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde mit 60 °C warmem Waschpuffer [0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) SSC] 1x kurz gespült und zweimal 30 min bei 60 °C gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Membran mit Frischhaltefolie bedeckt, für 24-72 h auf einer Phosphor Speicherfolie exponiert und eingescannt.

## 2.2.8 Quantitative Real Time PCR

### 2.2.8.1 Reverse Transkription für Real Time PCR

Für die Real Time PCR wurde DNase verdaute RNA mit dem Bio-Rad iScript Kit den Herstellerangaben entsprechend in cDNA umgeschrieben. Eingesetzt wurden jeweils 100 ng Gesamt-RNA (bzw. 50 ng RNA bei der Verwendung von halbierten Reaktionsansätzen). Anschließend wurde die cDNA 1:10 verdünnt und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

### 2.2.8.2 Real Time PCR mit SYBR Green

Für Real Time PCR mit SYBR Green Detektion wurde der Bio-Rad iQ SYBR Green Supermix oder der Sigma SYBR Green Jumpstart Taq Ready Mix den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Üblicherweise wurden 1-4 µl der 1:10 verdünnten cDNA und 7,5 pmol der Primer (siehe 2.2.8.1) in halbierten (25 µl) Reaktionsansätzen eingesetzt. Durch 2-Schritt Thermoprofile wurden die Reaktionszeiten und damit die Gefahr von unspezifischer Bindung der PCR Primer reduziert.

- geNorm Real Time PCR (*18S*, *Aktin*, *GAPDH*, *MRE11*, *PFR*, *TERT*, *Tub*):  
95 °C 3 min; (95 °C 15 sec; 55,5 °C 1 min, Datenerhebung) 40x  
Schmelzkurve: 95 °C 1 min; 50 °C 1 min; (50 °C 10 sec, Datenerhebung) 90x
- *ZFP3/TERT* Real Time PCR:  
95 °C 3 min; (95 °C 30 sec; 63 °C 35 sec, Datenerhebung) 40x  
Schmelzkurve: 95 °C 1 min; 50 °C 1 min; (50 °C 10 sec, Datenerhebung) 100x
- *EP1 3'UTR (ΔLII)/TERT* Real Time PCR:  
95 °C 3 min; (95 °C 30 sec; 56 °C 35 sec, Datenerhebung) 40x  
Schmelzkurve: 95 °C 1 min; 50 °C 1 min; (50 °C 10 sec, Datenerhebung) 100x

Die Spezifität der Reaktion wurde im Bezug auf Anlagerungstemperatur, sowie Primerkonzentrationen optimiert und durch Schmelzkurvenanalyse und im 2% (w/v) Agarosegel überprüft. Die Linearität der Detektion wurde für alle untersuchten Gene über den gesamten Messbereich verifiziert.

Die Effizienz lag zwischen 90% und 105%, der Korrelationskoeffizient der Standardkurve betrug in allen Fällen  $>0,95$  (Daten nicht gezeigt). Die Auswertung erfolgte mit dem Bio-Rad iCycler iQ 3.1 oder iCycler iQ 5 Programm, sowie mit Microsoft Excel unter Anwendung der geNorm (Vandesompele et al. 2002), sowie LinRegPCR (Ramakers et al. 2003; Ruijter et al. 2009) Applikationen und den von Livak und Schmittgen (2001) bzw. Pfaffl (2001) beschriebenen Methoden. Für die gleichzeitige Analyse mehrerer 96-Loch Platten wurden zu Kalibrierungszwecken jeweils Reaktionen mit Verdünnungsreihen (1:10, 1:40, 1:160, 1:320) von AnTat 1.1 WT.Luc cDNA mit angesetzt.

### 2.2.8.3 Real Time PCR mit Hydrolysesonden

Für Real Time PCR mit TaqMan Hydrolysesonden wurde der Bio-Rad iQ Supermix oder der Sigma Jumpstart Taq Ready Mix for qPCR den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Üblicherweise wurden 1-4  $\mu$ l der 1:10 verdünnten cDNA, je 7,5 pmol der Primer und 25 pmol der Hydrolysesonde in halbierten (25  $\mu$ l) Reaktionsansätzen eingesetzt. Die Markierung der Sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (FAM bei *LUC* bzw. Texas Red bei *TERT*) ermöglichte die Verwendung der in dieser Arbeit hergestellten *TERT* Sonde in Multiplex PCR Ansätzen mit einer Aconitase Sonde (FAM) (Hahn 2007). Bei Verwendung von *LUC*- und *TERT* TaqMan Sonden wurden allerdings durch Multiplex Ansätze keine zufrieden stellenden Ergebnisse erreicht. Stattdessen wurden für jede Probe separate Reaktionen analysiert. Die damit verbundene gleichzeitige Messung unterschiedlicher Farbstoffe an verschiedenen Positionen des optischen Systems, erfordert bei dem verwendeten Gerätetyp vor jedem Experiment die Kalibrierung, mit Hilfe der „External Well Factor Solution“ (Bio-Rad). Durch 2-Schritt Thermoprofile [95 °C 3 min; (95 °C 15 sec; 55,5 °C 1 min) 40x] wurden die Reaktionszeiten und damit die Gefahr unspezifischer Amplifikation reduziert. Die Spezifität der Reaktion wurde im Bezug auf Anlagerungstemperatur, sowie Primer- (bzw. Sonden-) Konzentrationen optimiert. Die Linearität wurde über den gesamten Messbereich verifiziert. Die mittlere PCR Effizienz lag bei 97% ( $\pm 6$ ) für die Luciferase bzw. 92% ( $\pm 5$ ) für *TERT*. Die Spezifität der Reaktionen wurde im 2% (w/v) Agarosegel nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Alle Reaktionen wurden mindestens im (technischen) Duplikat angesetzt. Die Quantifizierung der Genexpression von *EP1* 3'UTR-Mutanten wurde zusätzlich für jede Zelllinie im biologischen Duplikat durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Bio-Rad iCycler iQ 3.1 Programm bzw. mit Microsoft Excel unter Anwendung der von Pfaffl (2001) beschriebenen Methode, die mögliche Unterschiede in der PCR-Effizienz der verschiedenen Reaktionen berücksichtigt. Der Korrelationskoeffizient der Standardkurve war stets  $>0,96$ . Für die gleichzeitige Analyse mehrerer 96-Loch Platten wurden zu Kalibrierungszwecken jeweils Reaktionen mit Verdünnungsreihen (1:10, 1:40, 1:160, 1:320) von AnTat 1.1 WT.Luc cDNA mit angesetzt.

### 2.2.9 Microarrays

Die genomweite Analyse der Expressionsunterschiede wurde in Kooperation mit den Labors von C. Clayton (ZMBH Heidelberg) und J. Hoheisel (Abteilung funktionelle Genomanalyse am DKFZ Heidelberg) durchgeführt. GSS-Microarrays von genomischer DNA aus *T. brucei* wurden von Stefanie Brems im Rahmen ihrer Doktorarbeit in Anlehnung an Diehl et al. (2002) hergestellt und ausgewertet (Brems 2006). Aufbau und Hybridisierungsbedingungen der DNA-Microarrays sind dort detailliert beschrieben. Zusammengefasst: PCR-Produkte unabhängiger Klone einer genomischen DNA-Bank von *T. brucei* TREU<sup>4</sup> 927/4 in *E. coli* DH10B [zur Verfügung gestellt von N. El-Sayed (TIGR<sup>5</sup>, Rockville USA)] wurden auf aminosilanisierte Glasträger aufgetragen und durch UV Bestrahlung fixiert. 75% der Amplifikate waren zwischen 1,8 und 2,5 kb lang. Im Gegensatz zu vorausgegangenen Experimenten (Diehl et al. 2002) konnte die Anzahl der für die Expressionsanalyse in dieser Arbeit auf die Microarrays aufgetragenen PCR-Produkte auf 24567 DNA-Sequenzen erhöht werden. Bei Annahme gleicher Wahrscheinlichkeit für alle DNA-Fragmente, beträgt die Sequenzabdeckung >85% des Genoms.

#### 2.2.9.1 Microarrayanalyse kälteschockinduzierter BSF

Nach Inkubation von MITat 1.2 BSF bei 20 °C für 4; 8 bzw. 16 h (biologische Triplikate) wurde die RNA isoliert, wie oben beschrieben (2.2.4.2.2 bzw. 2.2.4.3). Die Qualität wurde durch Anfärben der rRNA mit Ethidiumbromid nach elektrophoretischer Auftrennung überprüft (siehe 2.2.5 bzw. 2.2.6). Polysomale RNA wurde in Heidelberg elektrophoretisch mit dem Agilent RNA 6000 Nano Assay (Lab-on-a-Chip) überprüft (Brems 2006). Anschließend wurde mit Cy3- bzw. Cy5-dCTP fluoreszenzmarkierte cDNA der verschiedenen Konditionen hergestellt. Durch die Verwendung von oligo d(T)-Primern wurde auf mRNA als Vorlage selektioniert. Die cDNA jeder Kondition wurde mit der Kontroll-cDNA (37 °C) gemischt und kompetitiv auf Microarrays co-hybridisiert, wie von Brems (2006) beschrieben. Ein Wechsel der Cy-Farbstoffe zwischen den Konditionen führte zu keinem signifikanten Unterschied. Nach konfokaler Quantifizierung der Signalintensitäten an den einzelnen Spots, die direkt mit der Häufigkeit des entsprechenden Transkripts korrelieren, erfolgte die bioinformatische Datenanalyse von fünf Microarrays jeder Kondition mit der M-CHiPS Software (Fellenberg et al. 2002). Nach Normierung durch lineare Regression und Anwendung verschiedener Filter (*fitted intensities*: at least 40000; *ratio*: 3; *min/max separation*: 0) wurde eine Korrespondenzanalyse durchgeführt. Die Sequenzen von etwa 150 Transkripten, die diese Kriterien erfüllten, wurden identifiziert. Eine detaillierte Beschreibung befindet sich in Brems (2006).

---

<sup>4</sup> TREU: Trypanosomiasis Research, Edinburgh University, UK

<sup>5</sup> TIGR: The Institute for Genomic Research (inzwischen: J. Craig Venter Insititute), Rockville, USA

### 2.2.9.2 Microarrayanalyse nach Inkubation mit Dipyridamol

2; 4 oder 8 h nach Zugabe des PDE-Inhibitors Dipyridamol (gelöst in DMSO, Endkonzentration 20  $\mu$ M) zu einer logarithmisch wachsenden MITat 1.2 BSF Kultur, wurde entsprechend der in 2.2.4.2.2 beschriebenen Methode Gesamt-RNA isoliert (biologische Triplikate). Als Kontrolle diente Gesamt-RNA derselben Zelllinie, die 8 h mit DMSO inkubiert wurde. Nach reverser Transkription und Fluoreszenzmarkierung wurde jede Kondition mit der Kontrolle gemischt und in jeweils fünf Replikaten kompetitiv hybridisiert, wie in 2.2.9.1 beschrieben. Die Auswertung (Brems 2006) erfolgte anschließend durch Korrespondenzanalyse mit der M-CHiPS Software (Fellenberg et al. 2002).

### 2.2.10 Bestimmung von Transkriptgrößen durch 3'RACE PCR

Gesamt-RNA wurde aus AnTat 1.1 PCF isoliert und DNase behandelt, wie oben beschrieben (2.2.4.2.3). 500 ng RNA; 50 pmol Primer T17AP (bindet durch 17 Thymidine an den Poly-A Schwanz von mRNAs und enthält zusätzlich eine Adapter-Sequenz für den Primer AP) und 10 nmol dNTPs wurden in 20  $\mu$ l Reaktionen den Herstellerangaben für die Synthese einzelsträngiger cDNA entsprechend, 5 min bei 65 °C inkubiert um RNA-Sekundärstrukturen aufzuschmelzen, 1 min auf Eis abgekühlt und mit 4  $\mu$ l „5x first strand buffer“, 1  $\mu$ l 0,1 M DTT und 1  $\mu$ l (200 U/ $\mu$ l) SuperScript III Reverser Transkriptase (Invitrogen) 60 min bei 50 °C inkubiert. Die Verwendung von RNase Inhibitor war nicht erforderlich. Durch Hitzeinaktivierung (70 °C; 15 min) wurde die Reaktion gestoppt. Die 3'RACE (rapid amplification of cDNA ends) PCR der so hergestellten cDNA mit dem Primer AP (z. T. mit der Adapter Sequenz von T17AP identisch) und dem prozyklinspezifischen Primer EP1\_3'UTR\_SeqP erfolgte mit Taq DNA-Polymerase (New England Biolabs), nach Angaben des Herstellers (1 U Taq DNA-Polymerase; jeweils 25 pmol Primer; 10 nmol dNTPs; 1x ThermoPol Puffer; 2  $\mu$ l cDNA) bei folgendem Thermoprofil im Robocycler: 94 °C 1 min; (94 °C 30 sec; 54 °C 1 min; 72 °C 1 min) 30x; 72 °C 5 min; 4 °C  $\infty$ . Jeweils 10  $\mu$ l jedes Reaktionsansatzes wurden anschließend elektrophoretisch auf einem 2% (w/v) Agarosegel neben einer DNA-Leiter aufgetrennt. Die Größenbestimmung der Amplifikate erfolgte mit dem Programm Quantity One (Bio-Rad).

### 2.2.11 Sekundärstrukturen von Prozyklin 3'UTR-Mutanten

Alle theoretischen RNA-Sekundärstrukturen wurden unter Verwendung des Programms RNA mfold (Version 2.3) auf dem Server des Rensselaer Polytechnic Institute (New York, USA) <http://rpi.edu/> ermittelt (Zuker 2003). Diese Version ermöglicht Berechnungen von RNA-Strukturen bei verschiedenen Temperaturen (37 °C, 27 °C bzw. 20 °C). Die Standardwerte der anderen Parameter wurden beibehalten (*percent suboptimality*: 5; *upper bound*: 50; *window*: default; *maximum interior/bulge loop size*: 30; *maximum asymmetry of an interior/bulge loop*: 30; *maximum distance between paired bases*: no limit). Für die Berechnungen wurden die auf den Ergebnissen chemischer und enzymatischer Analysen (Drozd und Clayton 1999) basierenden Einschränkungen berücksichtigt, sofern betroffene Nukleinsäuren nicht durch Mutation verändert wurden. Modifikationen nach dem Format *P i O k* wurden in das entsprechende Programmfeld eingefügt.

Durch den Befehl  $P$  („prohibit“) wird die Paarung der Nukleotide  $i$  bis einschließlich  $i+k-1$  beeinflusst. Steht an der dritten Stelle eine Null, paaren die Nukleotide  $i$  bis  $i+k-1$  mit keinem anderen Nukleotid (Zuker und Jacobson 1998). Die Einschränkungen nach Drozd und Clayton (1999) lauten:  $P\ 50\ 0\ 2$ ;  $P\ 64\ 0\ 3$ ;  $P\ 99\ 0\ 4$ ;  $P\ 109\ 0\ 3$ ;  $P\ 120\ 0\ 4$ ;  $P\ 148\ 0\ 2$ ;  $P\ 173\ 0\ 5$ ;  $P\ 195\ 0\ 1$ ;  $P\ 211\ 0\ 6$ . Die Parameter für die Berechnungen für 3'UTR-Mutanten befinden sich im Anhang (siehe 6.4).

## 2.2.12 HMMER Profilsuchen

### 2.2.12.1 Suche nach weiteren Proteinen der ZFP-Familie

Zur Identifikation zusätzlicher Proteine mit Domänenstruktur ähnlich der ZFP-Familie in *T. brucei*, wurde eine HMMER-Datenbanksuche (GeneDB Version May06\_v4) auf einem lokalen Rechner durchgeführt. Das HMM Profil wurde mit der Softwareversion 2.3.2 aus den Proteinsequenzen von ZFP1 (Tb927.6.3490), ZFP2 (Tb11.01.6590) und ZFP3 (Tb927.3.720) erstellt.

### 2.2.12.2 Suche nach Proteinen mit Cold Shock Domäne

Um Kandidatenproteine zu identifizieren, die eine Cold Shock DNA Binde-Domäne besitzen, wurde eine HMMER-Suche in lokalen Genomdatenbanken von *T. brucei* (GeneDB Version Jul05\_v4), *T. cruzi* (GeneDB Version 20050124\_v4.0), sowie *L. major* (GeneDB Version 20050601\_v5.2) durchgeführt. Das entsprechende HMMER-Sequenzprofil wurde anhand der Kälteschock Protein Domäne (CSP, Interpro: IPR011129) der SMART Datenbank (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) erstellt, die Proteinsequenzen mit CSD-Domäne (Interpro: IPR002059) als Subfamilie einschließt.

## 2.2.13 Konzentrationsbestimmung von Gesamtprotein

Die Bestimmung von Gesamtprotein-Konzentrationen im Zellextrakt (siehe 2.2.14) wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm nach dem Standard Protokoll des Bio-Rad Protein Assay Kits bestimmt, um Verluste bei der Herstellung von Zellextrakten für den Luciferase-Assay zu überprüfen. Als Vergleich dienten Standardkurven aus BSA-Verdünnungsreihen.

## 2.2.14 Luciferase Reporterassay

Die Messung der Luciferaseaktivität (Glow-Type) wurde in Anlehnung an das von Engstler und Boshart (2004) beschriebene Protokoll durchgeführt:  $7,5 \times 10^6$  Zellen wurden geerntet (BSF 1400 g; 10 min; RT bzw. PCF 900 g; 10 min; RT), in TDB resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300  $\mu$ l Lysepuffer resuspendiert und durch dreimaliges abwechselndes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen unter leichtem Schütteln im 37 °C Wasserbad lysiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation (10000 g; 10 min; 4 °C) sedimentiert und 290  $\mu$ l des löslichen Extrakts in ein neues Gefäß überführt. Vor jeder Messung im Luminometer wurden 90  $\mu$ l Luciferase Assay Reagenz mit 10  $\mu$ l Zellextrakt (entspricht  $2,5 \times 10^5$  Zellen) gemischt und 100 sec bei RT inkubiert. Die Messdauer wurde auf 10 s festgesetzt. Die Übertragung der Messwerte an einen über eine serielle Schnittstelle verbundenen Computer, erfolgte mit dem Programm Terra Term Pro. Es wurden jeweils mindestens zwei komplett unabhängige Experimente durchgeführt.

### 2.2.15 SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen aus Zelllysaten nach Molekulargewicht wurde mittels denaturierender, diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (PAGE) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Polyacrylamidgele wurden entsprechend den Herstellerangaben gegossen. Für die Elektrophorese von mini-Gelen wurden 10-15 µl Zelllysate pro Spur aufgetragen und in Laemmli Laufpuffer bei 20 mA pro Gel aufgetrennt, bis die Lauffront das Gelende erreichte.

### 2.2.16 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die in 2D Lysepuffer resuspendierten Zellextrakte wurden zentrifugiert (17600 g; 2 h; 20 °C) und die Überstände in die Kanäle der IEF-Zelle pipettiert, bevor die Gelstreifen mit immobilisiertem pH Gradient (IPG) der entsprechenden Länge luftblasenfrei aufgelegt wurden. Nach Übersichten mit Mineralöl erfolgte die aktive Rehydrierung (50 V; 16 h; 20 °C). Vor der isoelektrischen Fokussierung wurden mit VE H<sub>2</sub>O angefeuchtete Filterpapierstücke zwischen Elektroden und Gelstreifen gelegt. Der Stromfluss wurde auf 50 µA pro IPG-Streifen begrenzt, die Temperatur auf 20 °C eingestellt. Folgende Fokussierungsbedingungen wurden angewendet: für 7 cm Streifen: 200 V, 2 min [linear (l)]; 200 V, 1 h (l); 4000 V, 10000 Vh [rapid (r)]; für 17 cm Streifen: 200 V, 1 h (r); 1000 V, 30 min (l); 1000 V, 1 h (r) 10000 V, 1 h (l); 10000 V, 60000 Vh (r)]. Um den Verlauf von Spannung und Stromstärke verfolgen zu können, wurde die IEF Zelle über die RS232 Schnittstelle mit einem Computer verbunden. Die Anzeige der Daten erfolgte mit dem Programm Quick term.

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurde das Mineralöl vorsichtig mit feuchtem Whatman-Papier von den IPG-Streifen getupft, diese für je 15 min in Puffer A und B äquilibriert und kurz in Laemmli Laufpuffer gespült. Anschließend wurden die IPG-Streifen jeweils neben einem Filterpapier, in das Protein Marker eingetrocknet wurde, auf ein Polyacrylamidgel (10-12%) aufgebracht und luftblasenfrei mit 0,5% Agarose [(w/v) in Laemmli Laufpuffer, mit einer Spatelspitze Bromphenolblau] überschichtet. Die Elektrophorese von mini-Gelen erfolgte bei 20 mA pro Gel. In der Protean Plus Dodeca Gelkammer wurde eine Spannung von 200 V angelegt und die Puffertemperatur mit dem Multitemp III Kryostat auf 20 °C eingestellt.

### 2.2.17 Western Blot

Nach Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Proteine nach der von Kyhse-Andersen (1984) beschriebenen Methode durch Semi-Dry Blot auf eine zuvor durch kurzes Schwenken in Methanol prä-äquilibrierte Immobilon-FL PVDF-Membran übertragen: Die der Anode zugewandten zwei Lagen Whatmanpapier wurden in Anodenpuffer getränkt und das Gel sowie die in H<sub>2</sub>O gespülte Membran aufgelegt. Darauf wurden noch zwei Lagen in Kathodenpuffer getränktes, Whatmanpapier gelegt. Der Transfer erfolgte mit 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 60 min. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT in PBS/5% (w/v) Magermilchpulver geblockt.



Es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper [in PBS/0,1% (v/v) Tween-20/1% (w/v) Magermilchpulver] für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C. Nach drei Waschschritten mit PBS/0,2% (v/v) Tween-20 für je 5 min, wurde die Membran im Dunkeln für 1 h bei RT im Sekundärantikörper [in PBS/0,1% (v/v) Tween-20/1% (w/v) Magermilchpulver] inkubiert. Nach drei Waschschritten für je 5 min mit PBS/0,2% (v/v) Tween-20, wurde mit PBS gewaschen und die Membran anschließend im Dunkeln getrocknet. Die Detektion der Banden erfolgte auf dem Odyssey Infrarot Scanner (LI-COR).

### 2.2.18 Silberfärbung

Die Silberfärbung von Polyacrylamidgelen wurde durchgeführt, wie in Chevallet et al. (2006) beschrieben. Kurz: die Gele wurden ÜN in Fixierlösung geschwenkt (nach 1 h 1x gewechselt), für je 20 min in 30% (v/v) Ethanol (tech.), 15% (v/v) Ethanol (tech.) bzw. VE H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend für 1 h in Sensibilisierungslösung geschwenkt. Nach zweimaligem Waschen mit VE H<sub>2</sub>O für 30 sec wurden die Gele lichtgeschützt für 30 min in Silbernitrat-Lösung geschwenkt, bevor erneut dreimal für 30 sec mit VE H<sub>2</sub>O gewaschen wurde. Nach Zugabe des Entwicklers (nach 2 min 1x gewechselt), wurde die Färbung unter permanentem Schwenken beobachtet. Bei deutlich detektierbaren Signalen wurden die Gele kurz in VE H<sub>2</sub>O gespült, die Färbereaktion für 20 min mit 0,5% (w/v) Glyzin gestoppt und zuletzt dreimal für 10 min in VE H<sub>2</sub>O gewaschen.

Für die gleichzeitige Silberfärbung mehrerer großformatiger 2D Gele aus Markierungsexperimenten mit <sup>32</sup>P, wurde dieses Protokoll mit dem Dodeca Stainer (Bio-Rad) der AG Parniske durchgeführt.

### 2.2.19 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Der Expression des VSG-Typs auf der Oberfläche von BSF Trypanosomen (VSG 221 bei MITat 1.2 bzw. VSG 117 bei MITat 1.4) wurde durch Fluoreszenz-Mikroskopie nach Immundetektion durch spezifische Antikörper (Ferguson et al. 1986) überprüft. Dazu wurde das Zellpellet (1400 g; 10 min; 4 °C) von 10<sup>6</sup> Zellen nach Sedimentieren in 1 ml Medium resuspendiert, für 5 min bei RT in 2% (w/v) Formaldehyd fixiert und nach drei Waschschritten mit je 1 ml PBS vorsichtig in 300 µl PBS resuspendiert. Ein rundes, poly-L-Lysin beschichtetes Deckgläschen wurde in eine 24-Loch Platte gegeben und 50 µl der fixierten Zellen darauf getropft. Nach 10 min wurde im Lichtmikroskop das Absetzen der Zellen auf dem Deckgläschen überprüft und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper erfolgte verdünnt in PBS/1% (w/v) BSA für 1 h bei RT. Nach zwei zehnmütigen Waschschritten mit PBS, wurde im Dunkeln für 1 h bei RT mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach vier fünfminütigen Waschschritten mit PBS wurde das Deckgläschen auf einen Objektträger aufgebracht und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Eine Auswahl der Immunfluoreszenzaufnahmen befindet sich im elektronischen Anhang (siehe 6.7).



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Experimentelle Strategie

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Frage, ob es möglich ist, ein für die Kälteschockregulation des Prozyklings verantwortliches *cis*-Element zu kartieren. Dazu wurde eine systematische Mutationsanalyse der *EP1* 3'UTR durchgeführt. Veränderungen in der Sekundärstruktur galt es hierbei zu vermeiden. Die korrekte 3'-Prozessierung wurde für alle Mutationen überprüft. Die Konstrukte wurden stabil und *in situ* in Trypanosomen integriert. Probleme die möglicherweise bei Verwendung transienter Transfektanden oder Integration in fremde genomische Loci auftreten, wurden so vermieden. Durch Quantifizierung von mRNA sowie Reporterexpression sollen die Effekte auf posttranskriptioneller und translationaler Ebene unterschieden werden. Zur Differenzierung von kälteschockspezifischer bzw. stadienabhängiger Regulation, wurden neben BSF auch PCF analysiert. Da die Expressionsunterschiede zwischen diesen Konditionen extrem groß sind, jedoch auch feine Unterschiede quantifiziert werden sollten, wurde der Validierung des in dieser Arbeit verwendeten Reporters eine große Rolle beigemessen. Das Luciferase Protein bot sowohl die ausreichende Sensitivität für den Nachweis in BSF, als auch den nötigen linearen Messbereich um die Unterschiede zwischen den Stadien darzustellen.

Neben der spezifischen Mutationsanalyse der *EP1* 3'UTR galt es, coregulierte Gene zu identifizieren. Eine vergleichende Transkriptomanalyse wurde durchgeführt, um kälteschockabhängige Unterschiede in der Genexpression zu identifizieren. Durch Gegenüberstellung der mRNA-Sequenzen und -Strukturen von Kandidatengenen mit dem postulierten Kälteschockelement in der *EP1* 3'UTR, sollen Konsenselemente erkannt werden. Die Isolierung von an diese RNA-Motive bindenden Proteinen, würde am Beispiel der Kälteschockregulation von Prozyklin interessante Einblicke in den einzigartigen Mechanismus der Genregulation bei Kinetoplastiden geben und darüber hinaus helfen, den Prozess der Differenzierung von *T. brucei* besser zu verstehen.

### 3.2 Eingrenzung von *cis*-Elementen für Kälteschockregulation

#### 3.2.1 Wahl des Reportergens

Prozyklin ist eine Multigenfamilie mit je zwei *EP1*-, *EP2*-, *EP3*- und *GPEET*-Allelen (siehe Abb. 6). In ein Allel wurden zielgerichtet 3'UTR-Mutanten integriert. Die spezifische Detektion der dadurch vermittelten Expressionsunterschiede, erfolgte durch ein transgenes Reportergen. Es wurde bereits gezeigt, dass der Kälteschockeffekt unabhängig vom Reporter ist und dass die Kinetik der Expression mit der des endogenen Gens vergleichbar ist (Engstler und Boshart 2004).

GARP, das Prozyklin-Analog in *T. congolense*, das für die Untersuchung der Genexpression von Mutanten bei PCF als Reporter beschrieben wurde (Furger et al. 1997), kommt für diese Analyse nicht in Frage, da der dynamische Bereich der Detektion bei quantitativem Western Blotting für den geplanten Vergleich der >1000 fachen Expressionsunterschiede von BSF und PCF nicht ausreicht

und zudem stadienspezifisch variierende, posttranslationale Modifikationen des GARP Proteins (Schurch et al. 1997) die Analyse erschweren würden. Der  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) Reporter (Jefferson et al. 1987) wurde im 96-Loch Format für Differenzierungsversuche von *T. brucei* verwendet (Sbicego et al. 1999). Die Sensitivität des GUS Reporters reichte jedoch nicht aus, um die in BSF relativ geringen Effekte der positiven Elemente der Prozyklin 3'UTR (1-40 und 16mer) zu reproduzieren (Wilson et al. 1999). Folgende Reporter standen schließlich zur Wahl: Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) (Gorman et al. 1982), die Fusion aus EP1 und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) (Engstler und Boshart 2004), sowie zwei verschiedene Luciferasen [LUC (Gould und Subramani 1988) bzw. deren Weiterentwicklung LUC+].

In publizierten Arbeiten zu vergleichbaren Fragestellungen bei *T. brucei*, die überwiegend in den Labors von C. Clayton (ZMBH Heidelberg) und I. Roditi (IZB Bern, Schweiz) durchgeführt wurden, fand häufig CAT als Reporter Verwendung. Die Detektion des an die Prozyklin 3'UTR fusionierten CAT-Reporters ist in BSF jedoch nur schwer möglich (Hotz et al. 1995; Hotz et al. 1997). Besonders die Detektion bei Zelllinien mit durch Mutationen zusätzlich reduzierter Expression, wurde als schwierig eingeschätzt. Andererseits ist die starke CAT-Expression, wie sie nach Kälteschockinduktion zu erwarten ist, für BSF Trypanosomen toxisch (Colasante et al. 2007). Die Vielzahl der in diesem Projekt zu untersuchenden Proben, sprach zusätzlich gegen den im Vergleich zur Detektion von Luciferase relativ aufwändigen, radioaktiven CAT-Assay. Die Verwendung von CAT-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Kits wurde aus Gründen der mangelnden Flexibilität des verwendeten 96-Loch Formates und der im Vergleich zu den alternativen Nachweismethoden hohen Kosten nicht in Betracht gezogen. Die in den Vorarbeiten exemplarisch durchgeführte, technisch extrem aufwendige Quantifizierung des EP1:GFP Signals durch Fluoreszenzmikroskopie, war für diese Arbeit ebenfalls keine Option. Eine durchflußzytometrische Analyse nach Immundetektion von EP1:GFP setzt die schonende Fixierung und Permeabilisierung der Zellen voraus. Die Reporterexpression steigt nach Kälteschock zwar an, jedoch bliebe das Protein bei monomorphen BSF aufgrund der intrazellulären Lokalisation für die Immundetektion unzugänglich. Die Prozedur ist zeit- und arbeitsaufwendig und wurde nur zu Vergleichszwecken getestet. Die Sensitivität des Nachweises reichte zudem nicht aus, um geringe Expressionsunterschiede bei schwacher Reporterexpression quantitativ aufzutrennen.

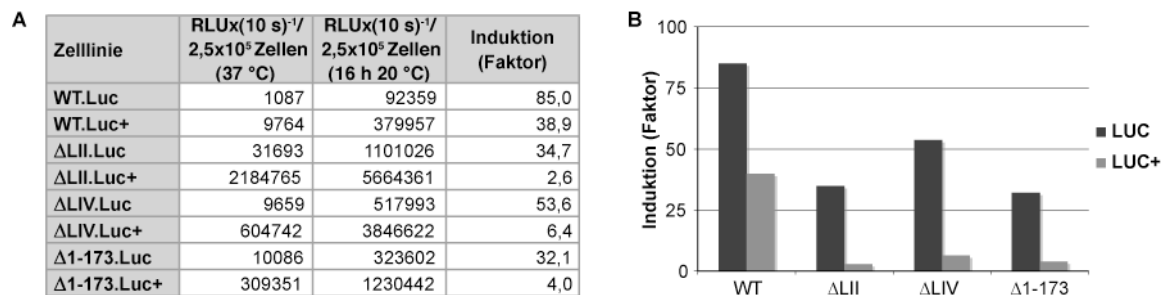
Als beste Alternative stellte sich das Luciferase Reportergen heraus, da die hohe Sensitivität des enzymatischen Nachweises (nach Angaben des Herstellers Promega, der auch CAT-Assays anbietet: ca. 100-fach größer als beim CAT-Assay) trotz schwacher Expression in BSF die exakte Quantifizierung ermöglicht. Gleichzeitig ist der lineare Messbereich (über acht Größenordnungen) groß genug, um auch die sehr viel stärkere Expression in PCF zuverlässig zu quantifizieren.

Als drittes Argument für die Wahl dieses Reportergens, diene die nach Optimierung robuste und verhältnismäßig schnelle experimentelle Durchführung, welche die Analyse von zahlreichen 3'UTR-Mutanten jeweils bei drei verschiedenen Konditionen ermöglichte.

Es gibt Hinweise, dass sowohl der *CAT*- (Sambrook et al. 1989), als auch der *LUC* ORF (C. Clayton, persönliche Kommunikation) destabilisierend auf mRNA wirken können. Für die in dieser Arbeit als Reportergen verwendete Luciferase wurde dies durch Vergleich von Konstrukten mit *EP1*- oder *LUC* ORF in *T. brucei* überprüft (siehe 3.2.6).

### 3.2.2 Verschiedene Luciferase Reportergene

Für erste Expressionsanalysen nach Kälteschock (Engstler und Boshart 2004) wurde vor allem der Luciferase ORF aus dem pGL2 Vektor (Promega) verwendet. Um die Effekte von Mutationskonstrukten noch besser unterscheiden zu können, wurde in einer Auswahl von pGAPRONE Konstrukten mit *EP1* 3'UTR-Mutationen die zu unterschiedlicher Expressionsstärke führen, der ursprüngliche *LUC* ORF durch den *LUC+* ORF aus dem pGL3 Vektor (Promega) ersetzt. Dieses Gen ist eine modifizierte Form der *Photinus pyralis* Luciferase aus pGL2 und unterscheidet sich vor allem durch: i) die Entfernung des C-terminalen Tripeptids, das ein Zielsteuerungssignal für den Transport in Peroxisomen (bzw. Glykosomen bei *T. brucei*) darstellt; und ii) Optimierung der verwendeten Codons für die Expression in pflanzlichen- und tierischen Zellen. Die somit erreichte Verstärkung der Expression soll ein besseres Verhältnis von Signal zu Hintergrund erreichen. Vor allem die Messgenauigkeit von geringen Expressionsunterschieden, beispielsweise bei uninduzierten BSF würde dadurch verbessert.



**Abb. 9: Vergleich der LUC und LUC+ Reporter**

(A) Luciferaseaktivität und Kälteschockinduktion von BSF Zelllinien mit dem *LUC* bzw. *LUC+* Reportergen unter Kontrolle der angegebenen 3'UTRs. (B) Grafische Darstellung der Induktionen aus (A).

Die Analyse einer repräsentativen Auswahl von Zelllinien mit dem *LUC+* Reporter (siehe Abb. 9), zeigt im Vergleich zu Zellen mit dem *LUC* Reporter einen deutlichen Anstieg der Expression, vor allem in uninduzierten Zelllinien. Möglicherweise wird der Repressionsmechanismus ausgehebelt, oder eine Komponente der intrazellulären Maschinerie der Proteinsynthese in PCF reicht nicht aus, um die Expression nach Induktion auf das entsprechende Niveau ansteigen zu lassen. In allen hier untersuchten Fällen wurden mit der modifizierten Form der Luciferase deutlich geringere Induktionsfaktoren gemessen. Die erwartete Verbesserung der Quantifizierung wurde dementsprechend nicht erreicht. Nach Induktion steigt die Expression von *LUC+* über die Zeit nur schwach an und liefert zu keinem Zeitpunkt stärkere Induktionsfaktoren, als bei Verwendung des

*LUC* Reportergens (Daten nicht gezeigt). Auch Colasante et al. (2007) berichten von irreführenden Ergebnissen bei der Untersuchung der Genregulation von *T. brucei* mit stark exprimierten Reportern. Für die Analyse sämtlicher Zelllinien mit 3'UTR-Mutation wurde in dieser Arbeit deshalb das nicht modifizierte Luciferase Reportergen (*LUC* aus dem pGL2 Vektor) verwendet. Die im Vergleich zur modifizierten Luciferase schwächere Expression ermöglicht die Analyse der Expression von *in situ* integrierten Reportergenkonstrukten. Es wurde bereits gezeigt, dass die Kälteschockinduktionen der *LUC* und *EP1:GFP* Reportergene mit der des endogenen Prozyklin Gens vergleichbar sind (Engstler und Boshart 2004), was die Auswahl bestätigt.

### 3.2.3 Optimierung des Luciferase-Assays

Durch Verwendung der „Glow-Type“ Detektionsmethode für die Luciferaseexpression wurde eine höhere Messstabilität über die Zeit erreicht. Die Zugabe von Coenzym A (CoA) in den Reaktionsansatz erhöht den enzymatischen Umsatz, was zu gleichzeitiger Verbesserung des Signal- zu Hintergrund Verhältnisses führt (Bronstein et al. 1994). Die Veränderung der Expression in Zellextrakten über die Zeit wurde überprüft. Nach einer nur wenige Sekunden dauernden Verzögerung, blieb die Intensität des Signals für etwa 30 Minuten konstant (Brenndörfer 2003). Alle Reaktionen wurden deshalb vor der Messung für 100 sec bei RT inkubiert.

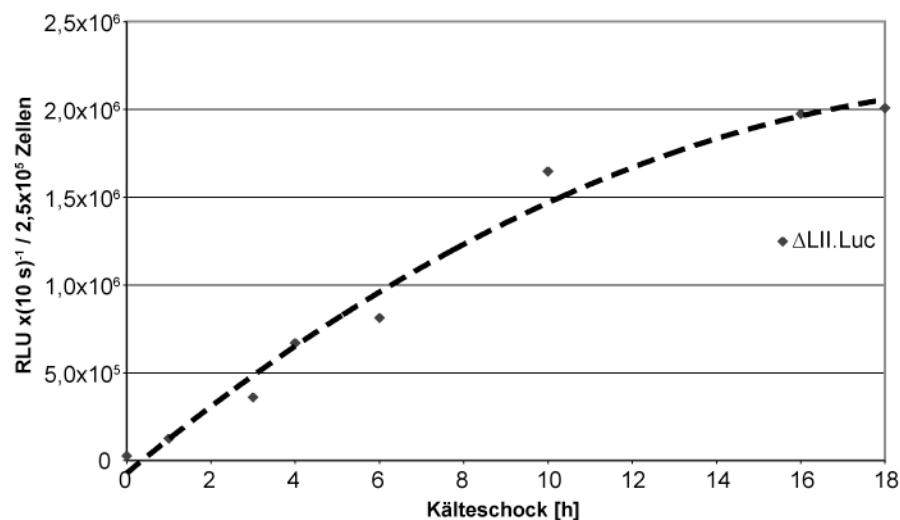


Abb. 10: Zeitverlauf der Luciferaseaktivität von *T. brucei* BSF nach Kälteschockinduktion

Die Änderung der Luciferaseexpression nach Kälteschockinduktion wurde in Zeitverlauf-Experimenten überprüft (siehe Abb. 10). Die ersten Ergebnisse haben gezeigt (Engstler und Boshart 2004), dass die Luciferaseaktivität in den ersten 5 h ansteigt, jedoch nach 6 h in ein Plateau überzugehen scheint. Das in dieser Arbeit durchgeführte, länger andauernde Zeitverlauf-Experiment mit der identischen BSF Zelllinie (Konstrukt pGAPRONE  $\Delta$ LII.Luc) verdeutlicht jedoch, dass die Expression über die ersten 16 h relativ gleichmäßig zunimmt. Inkubationszeiten >18 h wurden nicht untersucht. Die Luciferaseaktivität wurde deshalb, soweit nicht anders angegeben, nach Kälteschockinduktion für 16 h durchgeführt, um maximale Unterschiede in den Expressionsniveaus der untersuchten Zelllinien zu erreichen.

### 3.2.4 Normierung der Luciferaseexpression

Kälteschockinduktion führt in BSF zu einer veränderten Zellmorphologie. Bei Bestimmung der Zelldichte mit Hilfe eines Hämozytometers unter dem Lichtmikroskop wird außerdem beobachtet, dass die Bewegungen der Zellen erkennbar verlangsamt sind. Dies erschwert die genaue Bestimmung der in den Reporterassay eingesetzten Zellzahlen. Zur Kontrolle und auch um mögliche Verluste bei der Herstellung von Zellextrakten korrigieren zu können, wurde nach Quantifizierung der Luciferaseexpression die Gesamtprotein-Konzentration im Zellextrakt nach Bradford (1976) bestimmt. Innerhalb der getesteten Konditionen (BSF 37 °C, BSF 16 h 20 °C und PCF 27 °C), konnte dabei nach Optimierung des Reporterassays und zunehmender Erfahrung bei der Herstellung von Zellextrakten kein Unterschied bei der Proteinmenge festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Von Navarro und Cross (1998) wird im Vergleich zu BSF von einer zwei- bis dreifach höheren enzymatischen Aktivität rekombinanter Luciferase in Zellextrakten aus PCF berichtet (Claudia Ochatt, unpublizierte Daten). Entsprechende Kontrollexperimente wurden für den in dieser Arbeit verwendeten Reporterassay analog durchgeführt (Heitmüller 2007). Bei den getesteten Bedingungen für Zellaufschluss, enzymatische Reaktion und Messung, konnte hierbei zwischen Zellextrakten aus BSF und PCF kein Unterschied in der spezifischen Luciferaseaktivität festgestellt werden. Die widersprüchlichen Ergebnisse werden auf die Verwendung unterschiedlicher Reaktionsbedingungen zurückgeführt. Eine nachträgliche Korrektur der Messwerte wie von Navarro und Cross (1998) beschrieben, war dementsprechend nicht erforderlich.

### 3.2.5 Identifikation eines Referenzgens für die Real Time PCR

Um einen akkuraten Vergleich von mRNA-Mengen mittels quantitativer Real Time PCR zu ermöglichen, war zunächst die Identifizierung eines geeigneten Referenzgens erforderlich. Mit Hilfe des geNorm Programms (Vandesompele et al. 2002) wurden aus einer Kandidatenliste Gene identifiziert, die sowohl stadienspezifisch, als auch nach Kälteschockinduktion stabil exprimiert werden (Brenndörfer und Boshart 2010, eine ausführliche Dokumentation des Programms befindet sich im elektronischen Anhang 6.7). Die Auswahl der Kandidatengene erfolgte nach unterschiedlichen Kriterien. *Tub* wurde bereits in einer vergleichbaren Analyse als Referenzgen eingesetzt (Engstler und Boshart 2004). Für weitere Gene gab es Hinweise für stabile Expression in den untersuchten Lebensstadien [*Aktin* (Ben Amar et al. 1988), *MRE11* (Tan et al. 2002), *TERT* (Dreesen et al. 2005)]. Aufgrund der ähnlichen Expression des PFR-Proteins in den untersuchten Konditionen (Engstler und Boshart 2004), wurde das *PFR2*<sup>6</sup> Gen ebenfalls in die Untersuchung mit einbezogen. Eine umfassende Literaturanalyse (Suzuki et al. 2000) von Expressionsstudien bei verschiedenen Organismen, die 1999 in „high impact journals“ publiziert wurden zeigte, dass *18S*,

---

<sup>6</sup> *PFR2* früher *PFR A* siehe Gadelha et al. (2004)

28S und *GAPDH* in über 90% der Experimente als Referenzgene dienten. Um durch Coregulation von Kandidatengenen bedingte, systematische Fehler bei der Analyse zu vermeiden, wurden nur solche Gene ausgewählt, die in verschiedene zelluläre Prozesse involviert- und auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind (siehe Tab. 1). Aus diesem Grund wurde nur ein rRNA Gen (18S) in die Analyse einbezogen.

Symbol	Name	Accession Nr.	Funktion	Amplikon Länge [bp]	Amplikon T <sub>m</sub> [°C]	qPCR Effizienz [%]
<b>18S</b>	ribosomale 18S Untereinheit	Tb927.7.6881	18S rRNA Untereinheit des Ribosoms	180	86,5	100,3
<b>Aktin</b>	Aktin A	Tb09.211.0630 (*)	Strukturprotein des Cytoskeletts	133	85,5	101,9
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase	Tb927.6.4280	Glykolyse und Glukoneogenese	122	86,0	99,4
<b>MRE11</b>	MRE11	Tb927.2.4390	DNA Reparatur	110	84,5	100,7
<b>PFR</b>	Paraflagellar Rod Protein 2 (früher auch PFR A)	Tb927.8.5010	Strukturprotein im Flagellum	75	86,0	98,8
<b>TERT</b>	Telomerase Reverse Transkriptase	Tb11.01.1950 (*)	Verlängerung der Telomere	108	86,5	102,7
<b>Tub</b>	Beta-Tubulin	Tb927.1.2350	Strukturprotein des Cytoskeletts	70	85,5	101,5

**Tab. 1: Kandidatengene für die Normierung der Real Time PCR**

Zusammenfassung der Kandidatengene für die Identifizierung eines Real Time PCR Referenzgens mit dem geNorm Programm. Vorläufige GeneBank Benennungen sind durch Sterne gekennzeichnet. Durch Schmelzkurvenanalyse mit der iCycler iQ Software (Bio-Rad) wurde der Schmelzpunkt (T<sub>m</sub>) für jedes Amplikon ermittelt. Die qPCR Effizienz wurde mit dem Programm LinRegPCR (Ramakers et al. 2003) berechnet.

Zunächst wurden robuste Real Time PCR Assays (SYBR Green Detektion) mit ähnlichen qPCR Effizienzen für alle sieben potentiellen Referenzgene bei identischem Thermoprofil etabliert. Werte über 100% deuten auf die Detektion unspezifischer Produkte möglicherweise aufgrund von Primerdimeren hin. In der hier beobachteten Größenordnung (<103%) haben diese jedoch keine Auswirkungen auf das Endergebnis der geNorm Analyse. Die mRNA-Expressionen wurden für jede untersuchte Kondition in je drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier technischen Replikaten bestimmt [siehe Abb. 11 (A)]. Spezifität und Linearität der Reaktionen wurden in Vorexperimenten für alle Primerpaare verifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Signale von Kontroll-Ansätzen ohne DNA blieben für die 18S, *Aktin*, *GAPDH*, *TERT* und *Tub* Primerpaare auch nach 40 qPCR Zyklen unter dem Schwellenwert. Lediglich die Reaktionen mit *MRE11* oder *PFR* Primerpaar zeigten schwache unspezifische Signale (Ct 36 bzw. Ct 37) mit deutlich unterscheidbaren Schmelztemperaturen (T<sub>m</sub> 76,5 °C bzw. T<sub>m</sub> 78,5 °C), die wahrscheinlich auf Primer Dimere zurückzuführen sind.

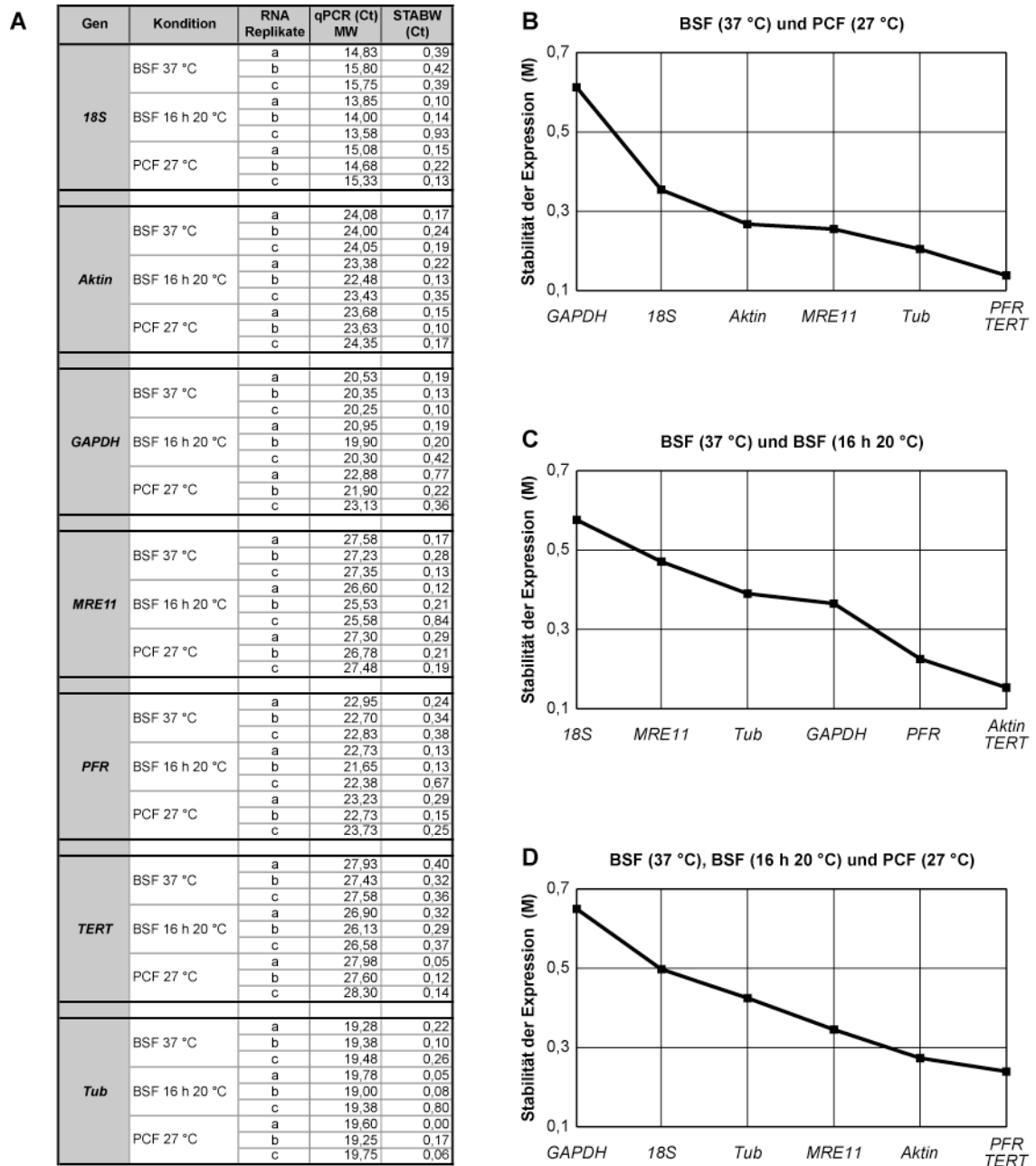
Die nicht-normalisierten Schwellenwert-Zyklen (Ct) variierten zwischen den verschiedenen Genen beträchtlich [Ct-Werte zwischen 14 (18S) und 28 (*TERT*)], jedoch nicht innerhalb der Replikate. Die gemittelten Ct-Werte wurden für jedes Gen in relative Häufigkeiten umgerechnet<sup>7</sup> und anschließend in das geNorm Programm importiert. Dieses ermittelt die Stabilität jedes Referenzgens aus einer

<sup>7</sup> Die Kondition mit der höchsten Expression innerhalb der untersuchten Konditionen wurde für jedes Gen als Kalibrator definiert und auf einen Wert von 1 festgesetzt. Die relativen Häufigkeiten für die anderen Konditionen errechnen sich daraus (unter Annahme einer PCR-Effizienz von 100%) mit der Formel:

$$x = 2^{-Ct(Test) - Ct(Kalibrator)}$$



Kandidatenliste für ausgewählte Konditionen durch Berechnung von Normierungsfaktoren, aus denen die Stabilität der Genexpression (M) für jedes der Kandidatengene berechnet wird [Details siehe Vandesompele et al. (2002) bzw. geNorm Handbuch im elektronischen Anhang (siehe 6.7)]. Sukzessives Ausschließen des unstabilsten Kandidatengens (mit dem höchsten Wert für M), ergibt eine Rangfolge der getesteten Referenzgene. Für Vergleiche der Expressionsänderungen zwischen BSF 37 °C und PCF 27 °C; BSF 37 °C und BSF 16 h 20 °C, sowie BSF 37 °C, BSF 16 h 20 °C und PCF 27 °C, wurden drei unabhängige Berechnungen durchgeführt. In Abb. 11 (B-D) sind die Ergebnisse dieser Analysen grafisch dargestellt.



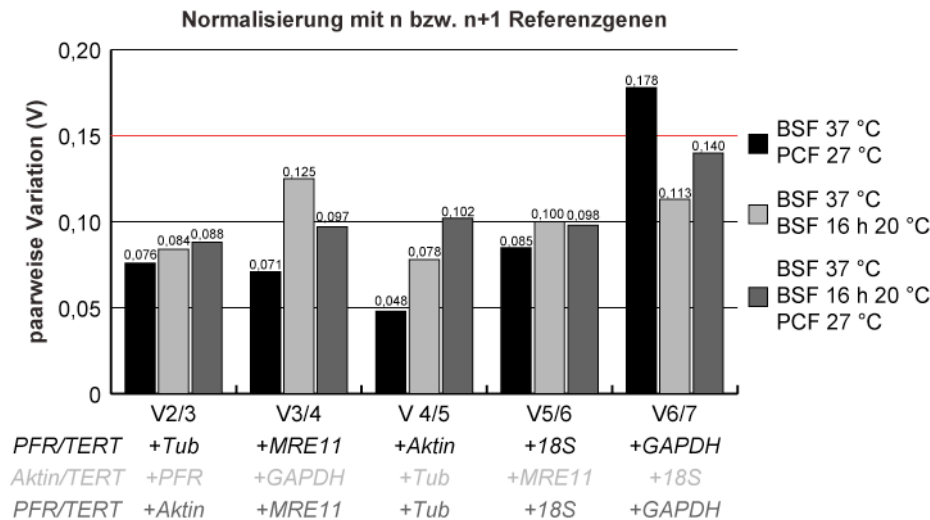
**Abb. 11: Eignung der Kandidatengene als Referenzgen**

(A) Zusammenfassung der Real Time PCR Ergebnisse für die geNorm Analyse. (B-D) Grafische Darstellung der Stabilität der Genexpression (M) nach Analyse mit dem geNorm Programm (Vandesompele et al. 2002). Gene mit dem geringsten M-Wert sind am stabilsten exprimiert. Da die Berechnung auf die Abweichung vom Mittelwert der Genexpression beruht, können die beiden am stabilsten exprimierten Gene mit dieser Methode nicht weiter bewertet werden. (B) Analyse der Konditionen BSF (37 °C) und PCF (27 °C). (C) Vergleich von BSF (37 °C) und BSF nach Kälteschock (16 h 20 °C) (D) Analyse des gesamten Datensatzes aus (A).

Im Hinblick auf Stadienregulation und bei Betrachtung aller drei Konditionen [siehe Abb. 11 (B und D)] zeigt das *GAPDH* Transkript die größte Variabilität in der Genexpression (den größten M-Wert). Als Anpassung an die, sich durch den Wirtswechsel stark ändernden Umweltbedingungen, unterscheiden sich die Stoffwechselwege von *T. brucei* BSF und PCF sehr voneinander. Im Blut von Säugern dient Glukose als Hauptenergiequelle, während die Fliegenform vor allem Prolin verstoffwechselt [zusammengefasst von Bringaud et al. (2006)]. Die Regulation des Gens für das Glykolyse-Enzym GAPDH in *T. brucei* entspricht demnach den Erwartungen. Dennoch wurde es von Anfang an bewusst als Kontrolle mit in die Analyse einbezogen.

Die Expression der 18S mRNA schwankt bei allen drei Berechnungen in den verschiedenen Konditionen ebenfalls stark [siehe Abb. 11 (B-D)]. Dies schließt 18S als Referenzgen für diese Arbeit aus. rRNA ist generell als Referenzgen für die quantitative PCR umstritten. Einerseits weil die starke Expression die Bestimmung der von der Software zur Korrektur der Rohdaten verwendeten „Real Time PCR baseline“ erschweren kann. Andererseits konnte beispielhaft ein deutliches Ungleichgewicht zwischen rRNA- und mRNA-Gehalt gezeigt werden (Solanas et al. 2001). Auch in *T. brucei* ändern sich die rRNA (und mRNA) -Mengen zwischen den proliferierenden BSF und PCF und den zellzyklusarretierten stumpy BSF dramatisch (Pays et al. 1993; Amiguet-Vercher et al. 2004). Da die geNorm Methode auf die Abweichung vom Mittelwert beruht, resultiert die Berechnung immer in zwei stabilsten Referenzgenen. In dieser Analyse zeigten *PFR* und *TERT* [siehe Abb. 11 (B und D)] bzw. *Aktin* und *TERT* [siehe Abb. 11 (C)] die stabilste Expression und damit die beste Eignung als Referenzgene in den entsprechenden Konditionen. Der geNorm Algorithmus wurde bereits für eine Vielzahl von Organismen und den Vergleich der verschiedensten Konditionen angewendet (Gabrielsson et al. 2005; Hoogewijs et al. 2008; Remans et al. 2008; Galiveti et al. 2009; Teste et al. 2009). Eine geeignete Vorauswahl der Kandidatengene ist für die valide Auswahl von Referenzgenen essenziell. Es ist keine Überraschung, dass die in dieser Arbeit identifizierten, besten Referenzgene von den in einer Analyse verschiedener *Leishmania* Lebensstadien vorgeschlagenen Genen abweichen (Ouakad et al. 2007), da unterschiedliche Kandidatengene ausgewählt wurden.

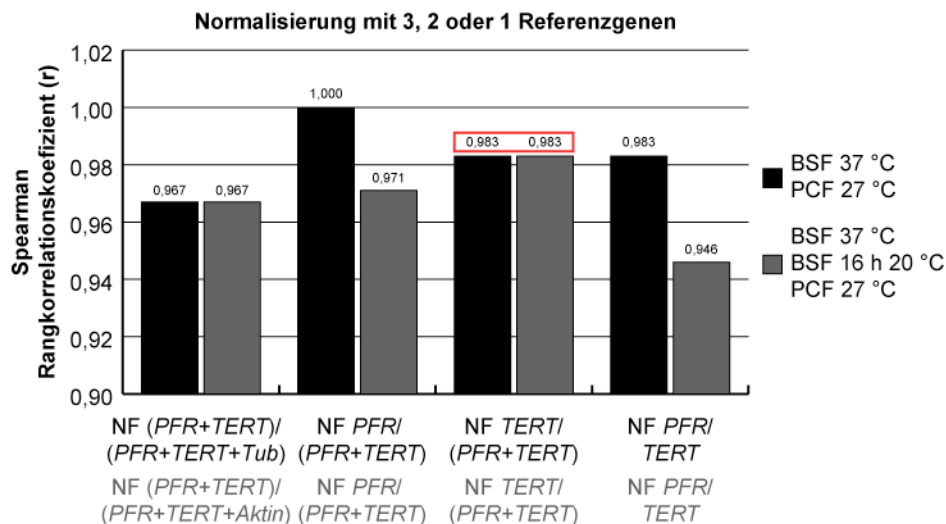
Je größer die Zahl der verwendeten Referenzgene, desto geringer die Wahrscheinlichkeit von fehlerhafter Normierung. Durch Vergleich der paarweisen Variation (V) von Normierungsfaktoren bei Verwendung von n bzw. n+1 Referenzgenen für die Normierung, ermittelt das geNorm Programm die minimal benötigte Anzahl von Referenzgenen. Dafür wird stets das am besten geeignete Gen als nächstes in die Analyse einbezogen. Durch Vergleich mit Microarraydaten wurde exemplarisch gezeigt, dass bei  $V < 0,15$  von valider Normierung ausgegangen werden kann (Vandesompele et al. 2002). Die in Abb. 12 dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass in allen drei Auswertungen bereits bei Verwendung von nur zwei Referenzgenen der empfohlene Schwellenwert von  $V = 0,15$  deutlich unterschritten wird. Die Berücksichtigung eines dritten Referenzgens ist demzufolge für valide Normierung eindeutig nicht erforderlich.



**Abb. 12: Vergleich der Normierung mit zwei oder mehr Referenzgenen**

Paarweise Variation (V) bei Verwendung von n bzw. n+1 Referenzgenen für die Normierung der Real Time PCR Daten mit dem geNorm Programm. Der empfohlene Schwellenwert von  $V=0,15$  (Vandesompele et al. 2002) ist rot dargestellt und wird in allen drei Berechnungen bei Verwendung von nur zwei Referenzgenen deutlich unterschritten.

Aufbauend auf den Ergebnissen der geNorm Analyse wurden für die in dieser Arbeit (BSF 37 °C, BSF 16 h 20 °C und PCF 27 °C) bzw. im Rahmen einer unabhängigen Fragestellung relevanten Konditionen (BSF 37 °C und PCF 27 °C) (Hahn 2007) weiterhin verglichen, welche Änderungen sich nach Normierung auf die stabilsten drei, zwei bzw. nur ein Referenzgen ergeben. Dies erfolgte durch Analyse der NF mit dem Spearman Rangkorrelationskoeffizienten ( $r$ )<sup>8</sup> analog zu Vandesompele et al. (2002). Beide Datensätze zeigen nach Normierung mit *TERT*, im Vergleich zur Verwendung von *PFR* und *TERT* als Referenzgene kaum Unterschiede ( $r=0,983$ , siehe Abb. 13).



**Abb. 13: Vergleich der Normierung mit drei, zwei oder nur einem Referenzgenen**

Normierungsfaktoren (NF) bei Verwendung der stabilsten drei, zwei oder nur einem Referenzgenen aus Abb. 11 mit dem Spearman Rangkorrelationskoeffizienten ( $r$ ). Perfekte Korrelation hat per Definition den Wert 1. In beiden dargestellten Auswertungen ist bei Verwendung von *TERT* im Vergleich zu *PFR* und *TERT* als Referenzgen die Korrelation nur unwesentlich verringert (rot hervorgehoben).

<sup>8</sup> Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient errechnet sich mit folgender Formel

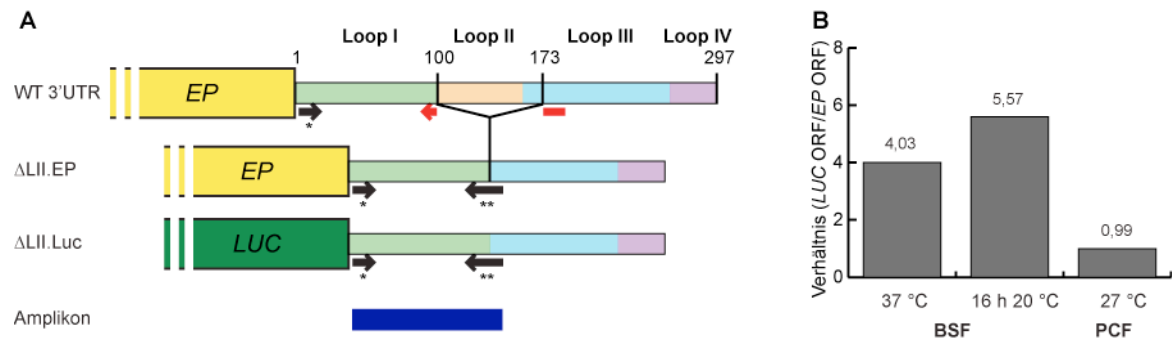
$$\text{(mit } D_i \text{ als Differenzen der Rangzahlen und } n > 4\text{): } r = 1 - \frac{6 * \sum_{i=1}^n D_i^2}{n * (n^2 - 1)}$$

Die vergleichsweise durchgeführte Normierung des gesamten geNorm Datensatzes aus Abb. 11 mit *TERT* bzw. *PFR* und *TERT*, ergab ebenfalls nur geringe Abweichungen (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde für alle weiteren Real Time PCR Experimente *TERT* als internes Referenzgen ausgewählt.

Je nach Anwendung erfolgte die qPCR Detektion mit SYBR Green oder durch TaqMan Hydrolysesonden. Obwohl die Anlagerungstemperaturen der verwendeten PCR Thermoprofile von 50-63 °C schwankten, ermöglichten die *TERT* Oligonukleotide in allen Fällen zuverlässige Detektion. Dieser sehr weite Temperaturbereich erhöht die Kompatibilität dieses Referenzgens zu anderen Real Time PCR-Assays und stellt damit eine wichtige Ressource für die Analyse von kälteschockabhängiger sowie stadienspezifischer Genexpression in *T. brucei* dar.

### 3.2.6 Einfluss des Reporters auf die Regulation

Da nicht *per se* davon ausgegangen werden konnte, dass die mRNA-Menge nach Integration des *LUC* ORF in den *EP*-Lokus unverändert bleibt und es im Speziellen Hinweise gab, dass der *LUC* ORF möglicherweise in BSF zu einer Stabilisierung der mRNA führt (C. Clayton, persönliche Kommunikation), wurde als Kontrolle die Änderung der mRNA-Expression in Abhängigkeit des ORF quantifiziert. Weil die zur direkten Messung der RNA Stabilität häufig verwendete Inhibierung der Transkription, z. B. durch Actinomycin D, unerklärbare Effekte [wie das Ansteigen der Prozyklin mRNA-Menge unmittelbar nach Zugabe des Inhibitors (Hotz et al. 1997)] zur Folge haben kann, wurde stattdessen die mRNA-Menge für Konstrukte mit *EP1* und *LUC* ORF durch Real Time PCR quantifiziert. Das Ergebnis dieser Methode sind nicht die mRNA-Halbwertszeiten, sondern die für diese Fragestellung relevanten, relativen Verhältnisse. Hierzu wurde ein Real Time PCR-Assay verwendet, der spezifisch die  $\Delta$ LII Mutation in der *EP1* 3'UTR detektiert [siehe Abb. 14 (A)]. Auf diese Weise können die Effekte des *EP*- bzw. *LUC*-ORF auf dieses Allel begrenzt analysiert werden. Durch stringente Bedingungen wurde die unspezifische Detektion der WT Prozyklin Loci in BSF vollständig verhindert. In PCF wurde eine geringe Fehldetektion festgestellt. Die Expression des Allels mit  $\Delta$ LII.EP Mutation in PCF wurde auf 100% festgesetzt. In WT PCF ergibt sich dementsprechend, durch Amplifikation des WT Allels, ein falsch-positives Signal von 0,17% (Daten nicht gezeigt). Dieser geringe Fehler wurde bei der Auswertung vernachlässigt.



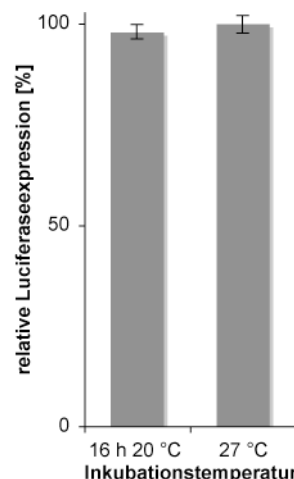
**Abb. 14: Kälteschockinduktion der mRNA ist unabhängig vom ORF**

(A) Schematische Darstellung des  $\Delta$ LII-Allel spezifischen Real Time PCR-Assays zur Detektion ORF-vermittelter Unterschiede der mRNA-Expression. Die real time PCR mit den Primern  $\Delta$ LII up1 (\*) und  $\Delta$ LII Sonde1 (\*\*) ergibt unabhängig vom Leserahmen nur bei dem Allel mit  $\Delta$ LII Mutation ein Amplikon (dunkelblau). Bei den WT Prozyklin Loci ist die Primer Bindestelle unterbrochen (rot dargestellt). Stringente PCR-Bedingungen verhindern Codetektion. (B) Vergleich der relativen mRNA-Expressionen von Zelllinien mit *EP*- (für jede Kondition festgesetzt auf 1) oder *LUC*-ORF nach interner Normierung auf das *TERT* Referenzgen.

Der in Abb. 14 (B) dargestellte Vergleich der relativen mRNA-Expressionen von  $\Delta$ LII Zelllinien mit *EP1*- oder *LUC*-ORF jeweils bei den Konditionen (BSF 37 °C, BSF 16 h 20 °C und PCF 27 °C) zeigt, dass der Austausch des ORFs in PCF keine Veränderung der mRNA-Expression zur Folge hat. Das Verhältnis von  $\Delta$ LII.EP zu  $\Delta$ LII.Luc liegt in PCF annähernd bei 1. Bei BSF vor- bzw. nach Kälteschock wurden in ihrer Höhe vergleichbare Faktoren (4,0 bzw. 5,6) gemessen. Die in dieser Arbeit im Vordergrund stehende Untersuchung von BSF  $\pm$ Kälteschock ist demnach möglich, während die größeren Unterschiede zwischen BSF und PCF auf mRNA-Ebene nur bedingt Schlussfolgerungen erlauben. Bei Verwendung des *LUC* Reportergens können die Effekte der 3'UTR auf die Stadienregulation der mRNA hier unterschätzt werden.

### 3.2.7 Induzierbarkeit durch Kälteschock ist stadienspezifisch

Kälteschock induziert in BSF die Luciferase Expression 85-fach (siehe Abb. 23). Durch analoge Inkubation einer prozyklischen Reporterzelllinie (AnTat 1.1 WT.Luc) für 16 h bei 20 °C konnte gezeigt werden, dass die im Vergleich zu BSF ohnehin stärkere Reporterexpression durch Kälteschock nicht zusätzlich induziert wird (siehe Abb. 15). Da kein Unterschied in der Reporterexpression festzustellen ist, wurde keine Quantifizierung der mRNA-Mengen durchgeführt.

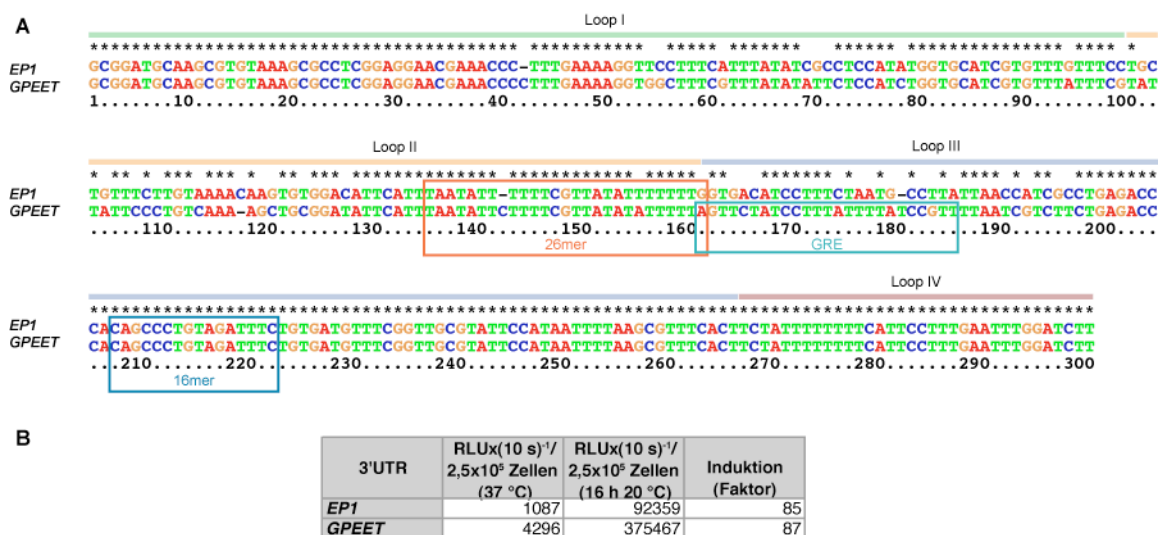


**Abb. 15: Keine Induktion durch Kälteschock in PCF**

Die Luciferaseexpression prozyklischer Reporterzelllinien (WT 3'UTR) wird im Gegensatz zu entsprechenden BSF (85-fache Induktion, siehe Abb. 23) durch Kälteschock (16 h 20 °C) nicht induziert.

### 3.2.8 Kälteschockinduktion durch *GPEET* 3'UTR

Für die Vermittlung der Kälteschockinduktion auf Prozyklin oder Reportergene ist die *EP1* 3'UTR nötig und hinreichend (Engstler und Boshart 2004). Die 3'UTRs der *EP1*- und *GPEET*-Prozyklone zeigen >87% Sequenzhomologie [siehe Abb. 16 (A)], was zu einer ähnlichen Sekundärstruktur führt (Vassella et al. 2004). Die Sequenzen der regulatorischen Elemente nt 1-40, 16mer und Loop IV (siehe 3.2.11.8) sind in den *EP1*- und *GPEET* 3'UTRs identisch, das 26mer unterscheidet sich in lediglich 3 nt. Dennoch gibt es spezifische Unterschiede, wie das „Glycerol Responsive Element“ (GRE, nt 160-184) (Vassella et al. 2004), das auf die *GPEET* 3'UTR beschränkt ist. Diese Sequenz liegt in dem Bereich, der die größte Heterogenität innerhalb der verschiedenen Prozyklin 3'UTRs aufweist. Das GRE ist unmittelbar im Anschluss an das 26mer lokalisiert, beide Elemente wirken jedoch in unterschiedlichen Stadien des Lebenszyklus. Während das 26mer den größten Effekt in BSF hat, wirkt GRE vor allem (destabilisierend) auf die Expression in späten PCF.



**Abb. 16: Vergleichbare Kälteschockinduktion auch durch *GPEET* 3'UTR**

(A) Nukleotidsequenzvergleich der *EP1* und *GPEET* 3'UTRs. Die Sequenzhomologie beträgt >87%. Übereinstimmungen sind durch Sterne gekennzeichnet. 16mer, 26mer und GRE sind eingerahmt. Zur besseren Orientierung sind die vier Loops der *EP1* Sekundärstruktur ebenfalls markiert. (B) Luciferaseaktivitäten von Reporterzelllinien mit *EP1*- oder *GPEET* 3'UTR sowie die daraus berechnete Induktionen durch Kälteschock.

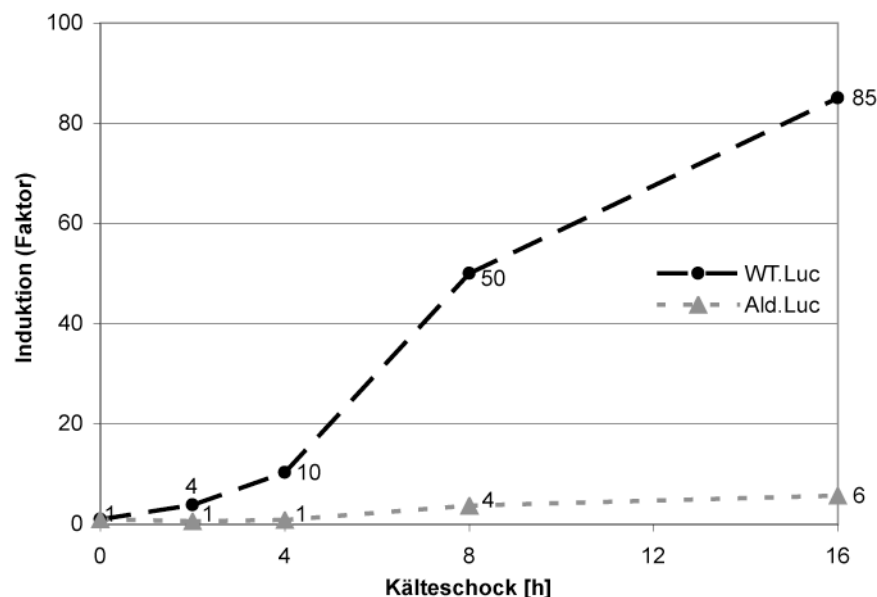
Durch Vergleich der Luciferase Reporterexpression von Zelllinien mit *EP1*- oder *GPEET* 3'UTR wurde gezeigt, dass die Sequenzunterschiede unter den getesteten Bedingungen auf den Mechanismus der Kälteschockregulation keinen Einfluss haben. Die Expression in BSF Zelllinien mit *GPEET* 3'UTR ist in Übereinstimmung mit den Daten aus Vassella et al. (2001) etwa vierfach stärker als mit *EP1* 3'UTR. Die Induktion nach Kälteschock ist in beiden Zelllinien vergleichbar stark: 85-fach mit der *EP1*- bzw. 87-fach mit der *GPEET* 3'UTR [siehe Abb. 16 (B)]. Der 3'UTR-Bereich an der Position des GRE hat demnach keinen Einfluss auf die Kälteschockregulation. Da bei der Reporterexpression kein Unterschied festzustellen war, wurde hier keine Quantifizierung der mRNA-Mengen durchgeführt.

### 3.2.9 Generelle Induktion nach Kälteschock

Reporterzelllinien mit Aktin-, Tubulin- oder Aldolase (nt 1-177) -3'UTR zeigten nach Integration in verschiedene genomische Loci drei- bis siebenfache Induktionen nach Kälteschock (Engstler und Boshart 2004). Nach Klonierung dieser trunkierten Aldolase 3'UTR in den in dieser Arbeit verwendeten pGAPRONE Vektor, konnte eine sechs bis zehnfache Induktion der Reporterexpression nach Kälteschock festgestellt werden. Parallele Vergleichsmessungen zeigen keinen Unterschied zu der in den Vorarbeiten verwendeten Zelllinie (mit pL20.Luc Konstrukt). Dadurch wurde direkt gezeigt, dass diese generelle Induktion unabhängig vom genomischen Locus ist. Sie ist weiterhin unabhängig vom verwendeten Reporter und hat nur geringe Auswirkungen auf die mRNA-Menge, sondern erhöht vor allem die Reporterexpression (siehe Abb. 30).

Da ähnliche Faktoren für drei 3'UTRs mit hoher Sequenzdiversität gemessen wurden, ist sehr unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um spezifische Effekte handelt. Dem steht die >85-fache, spezifische Induktion durch die *EP1* bzw. *GPEET* 3'UTR gegenüber. Als mögliche Erklärungen kommen z. B. die thermische Stabilisierung von mRNA bzw. interagierenden Proteinen oder Hemmung von proteolytischen Prozessen durch die gesenkte Temperatur in Frage.

In einem Zeitverlauf-Experiment wurde überprüft, ob sich die globale Induktion (am Beispiel der trunkierten Aldolase 3'UTR) durch kürzere Inkubationen bei 20 °C besser vom Kälteschockeffekt trennen lässt. Die in Abb. 17 zusammengefassten Ergebnisse verdeutlichen jedoch, dass dies nicht der Fall ist. Durch die vergleichsweise stärkere Zunahme der Expression bei der Zelllinie mit *EP1* 3'UTR, zeigen die Induktionsfaktoren der beiden Zelllinien die beste Trennung nach Induktion bei 20 °C für 16 h. Spätere Zeitpunkte wurden hier nicht untersucht, da nach längerer Inkubation nur eine geringe Steigerung der Kälteschockinduktion gemessen wurde (siehe Abb. 10).

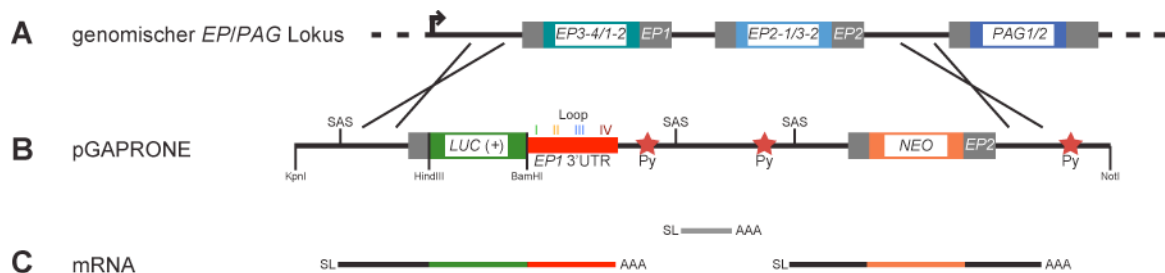


**Abb. 17: Optimale Dauer der Kälteschockinduktion**

Zeitverlauf-Experiment zur Trennung von generellem und *EP1* 3'UTR-vermitteltem Anstieg der Luciferase-expression nach Kälteschock. Die Induktionen des Reporters unter Kontrolle der WT *EP1* (schwarz) und Ald (nt 1-177) 3'UTR (grau) sind dargestellt. Die bestmögliche Unterscheidung wird nach Induktion für 16 h erreicht.

### 3.2.10 Strategie der Mutationsanalyse

Die Regulation stadienspezifischer Unterschiede bei der Prozyklinexpression erfolgt vor allem über die 3'UTR (Hotz et al. 1995). Für die Vermittlung der kälteschockabhängigen Regulation des *EP1* Gens ist die 3'UTR nötig und hinreichend (Engstler und Boshart 2004). Zur Identifikation von Sequenzen, die an den jeweiligen Regulationsprozessen beteiligt sind, wurden zahlreiche 3'UTR-Mutationen durchgeführt. Elemente, für die bereits ein Effekt bei der Stadienregulation beschrieben ist, sowie weitere Sequenzabschnitte wurden systematisch sowohl einzeln, als auch in Kombination miteinander untersucht (siehe Abb. 19 und Abb. 20). Durch sorgfältige Planung der Mutationen wurden Sekundärstruktur-Veränderungen in den verbleibenden Sequenzbereichen weitgehend vermieden (siehe 3.2.10.2).



**Abb. 18: In situ-Integration von Reportergergenkonstrukten ins Genom von *T. brucei***

Übersicht (nicht maßstabsgetreu) des *EP/PAG*-Locus (A) (Details siehe Abb. 6) und des transfizierten pGAPRONE Konstrukts (Furger et al. 1997) (B). Spleiß-Akzeptor-Stellen (SAS) und Erkennungsstellen wichtiger Restriktionsenzyme sind gekennzeichnet. Die stabile Integration in den *EP/PAG* Locus erfolgt durch zwei „crossing over“ Ereignisse. Die Konstruktion des Plasmids ist darauf ausgelegt, die beiden Prozyklin ORFs durch *LUC* bzw. *NEO* zu ersetzen, ohne weitere Bereiche zu verändern. Eine Vergrößerung der *EP1* 3'UTR (rot) inkl. aller durchgeführten Mutationen ist in Abb. 20 dargestellt. Für korrektes 3'-Spleißen wichtige pyrimidinreiche Sequenzen sind durch Sterne gekennzeichnet. Die Signale für die Polyadenylierung des ersten Transkriptes und das *trans*-Spleißen des folgenden Transkriptes sind unabhängig voneinander (Schurch et al. 1994; Vassella et al. 1994). In (C) sind die gespleißten mRNAs dargestellt. Das grau dargestellte Produkt enthält keinen ORF und wird abgebaut. SL: „spliced leader“ Sequenz, AAA: Poly-A Schwanz

21 3'UTR-Mutationen (siehe Abb. 19) wurden in ein pGAPRONE (Furger et al. 1997) Derivat kloniert, bei dem der *GARP* Reporter durch den *LUC* ORF ersetzt wurde. Dieser Vektor erlaubt die stabile Integration der Konstrukte in den *EP/PAG1*- oder *EP/PAG2*-Prozyklin Locus (siehe Abb. 18). Es wurde gezeigt, dass beide Loci in BSF zu identischer Expression führen (Schurch et al. 1997). Auf die Verwendung klonaler Zelllinien und die Analyse des Integrationsortes konnte dementsprechend verzichtet werden. Stattdessen wurden für die Analyse Pools der Transfektanden verwendet. Dies hat den zusätzlichen Vorteil, dass so über klonale Variationen gemittelt werden konnte. Durch die Verwendung des korrekten chromosomalen Kontextes wurden sekundäre Effekte auf die Genregulation vermieden. Die Überprüfung der korrekten mRNA-Prozessierung durch 3'RACE PCR (siehe 3.2.10.1) diente als zusätzliche Kontrolle.

Durch die Analyse der Reporterexpression von 3'UTR-Mutanten vor- und nach Kälteschock, sowie deren mRNA-Menge, sollen Elemente identifiziert werden die an der kälteschockabhängigen Regulation beteiligt sind. Analog sollen durch Vergleich der Mutationen zwischen uninduzierten BSF und PCF Effekte auf die stadienspezifische Regulation der Prozyklinexpression erkannt- und möglicherweise von denen der Kälteschockinduktion unterschieden werden.



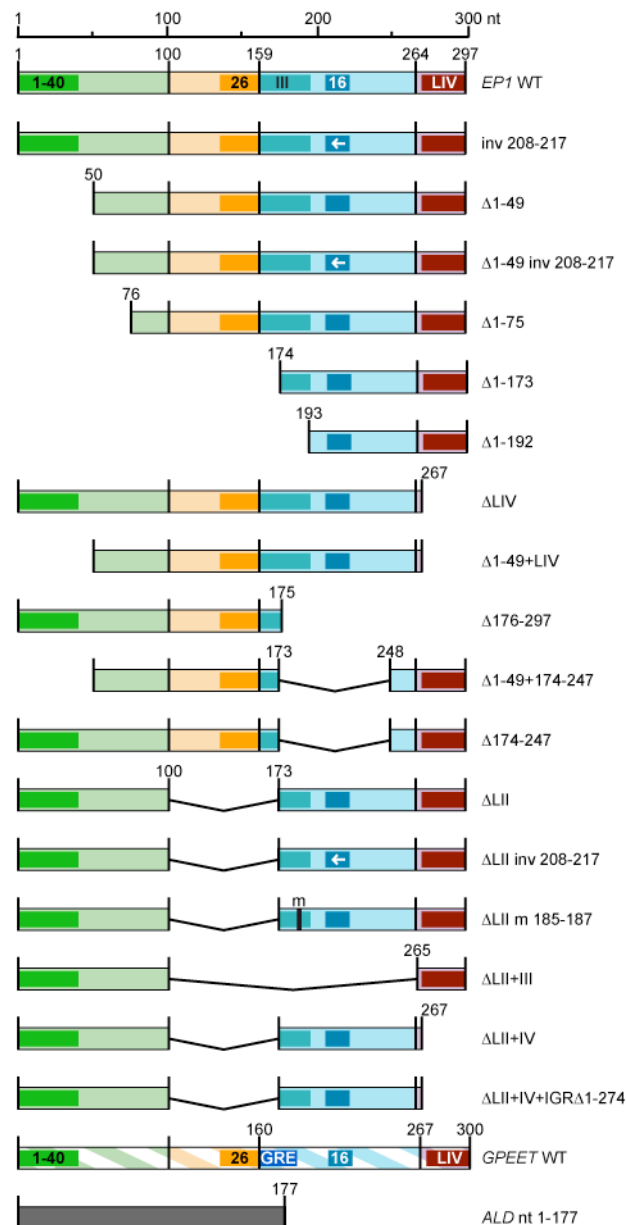
Einzelelemente	Loop I	Loop II	Loop III	Loop IV	IGR
EP1 WT					
$\Delta 1-49$	X				
$\Delta 1-75$	X				
GPEET WT			X		
inv 208-217			X		
$\Delta \text{LIV}$				X	

Kombinationen	Loop I	Loop II	Loop III	Loop IV	IGR
$\Delta 1-173$	X	X			
$\Delta 1-192$	X	X	X		
$\Delta 1-49+174-247$	X		X		
1-49 inv 208-217	X		X		
$\Delta 1-49+\text{LIV}$	X			X	
$\Delta \text{LII}$		X	X		
$\Delta \text{LII}+\text{III}$		X	X		
$\Delta \text{LII m } 185-187$		X	X		
$\Delta \text{LII inv } 208-217$		X	X		
$\Delta \text{LII inv } 208-212$		X	X		
$\Delta \text{LII inv } 210-215$		X	X		
$\Delta \text{LII inv } 213-217$		X	X		
$\Delta 174-247$			X		
$\Delta \text{LII}+\text{IV}$		X	X	X	
$\Delta 176-297$			X	X	
$\Delta \text{LII}+\text{IV}+\text{IGR}\Delta 1-274$	X	X	X	X	

**Abb. 19: Schematische Übersicht der Prozyklin 3'UTR-Mutationen**

Die gekennzeichneten (x) Bereiche wurden im Vergleich zur WT-Sequenz mutiert. Aufgrund der starken Sequenzhomologie [siehe Abb. 16 (A)] wird die GPEET 3'UTR als Substitutionsmutation im heterogenen Loop III betrachtet. Mit einer Ausnahme ( $\Delta \text{LII}+\text{IV}+\text{IGR}\Delta 1-274$ ) blieb die IGR unverändert.

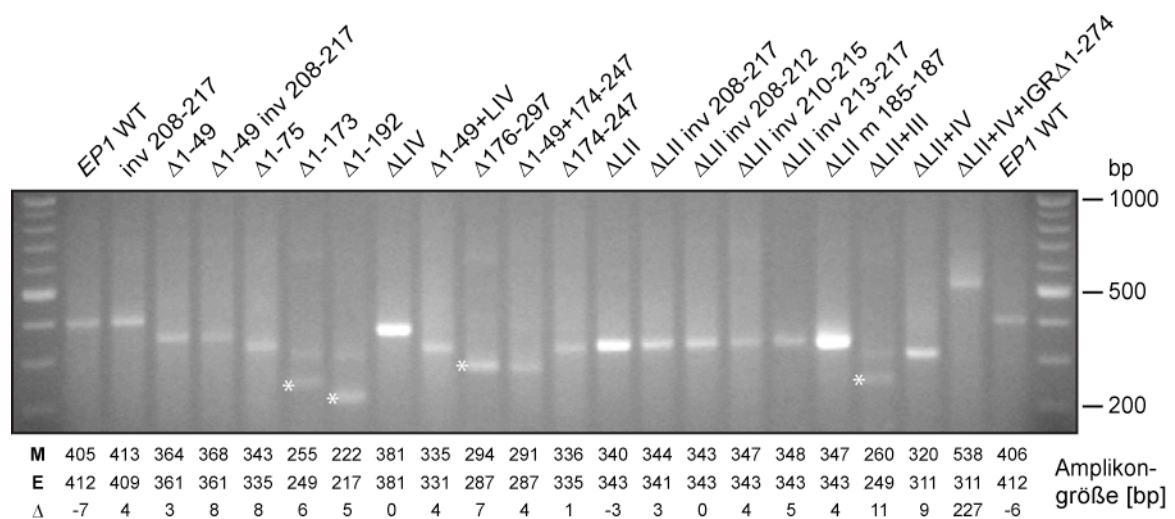


**Abb. 20: Zusammenfassung der Prozyklin 3'UTR-Mutanten**

Maßstabsgetreue Darstellung der 3'UTR-Mutationen. Pfeile markieren Inversionen, „m“ eine Punktmutation. Regulatorische Elemente sind gekennzeichnet [nt 1-40, 26mer, negatives Element (III), GRE, 16mer, Loop IV].

### 3.2.10.1 Prozessierung mutierter 3'UTRs

Die Genexpression bei *T. brucei* wird vor allem posttranskriptionell reguliert (siehe 1.5). Der mit der Polyadenylierung gekoppelte Spleiß-Prozess ist hierbei vor allem über die Bestimmung der 3'UTR-Länge für die Regulation relevant (Vanhamme und Pays 1995). Viele Gene besitzen alternative Prozessierungsstellen, die über einen Bereich von etwa 100 Basen vor dem *trans*-Spleiß Signal verteilt sind. Die Polyadenylierung der Prozyklin mRNA ist im Gegensatz dazu ungewöhnlich akkurat (Clayton und Hotz 1996). Sie wurde auch in Abwesenheit von Spleiß-Akzeptor-Stellen des abwärts gelegenen Gens gezeigt (Hehl et al. 1994). Die erforderlichen Sequenzbereiche in der Prozyklin IGR wurden experimentell kartiert (Hug et al. 1994; Schurch et al. 1994). Innerhalb der verschiedenen Prozykline sind diese konserviert und befinden sich in ähnlicher Entfernung der ORFs (siehe Abb. 18). Die Deletion dieser pyrimidinreichen Sequenz führt zur unvorhersehbaren Verwendung alternativer Spleißstellen, meist innerhalb der 3'UTR. Der Einfluss der 3'UTR auf die Prozyklin Prozessierung ist nicht vollständig geklärt. Veränderungen der 3'UTR können zu kryptischen Spleißstellen und somit zu Variation der Genexpression führen (Schurch et al. 1994; Furger et al. 1997). Um diesen Effekt bei der Quantifizierung der Expression von 3'UTR-Mutanten auszuschließen, wurden in dieser Arbeit die 3'-Enden aller Reportergeren Transkripte mit 3'RACE PCR kontrolliert. Da kein Beispiel für stadienspezifische Unterschiede im Spleißmuster von Prozyklintranskripten zwischen BSF und PCF bekannt ist, reichte hierfür die technisch einfachere Analyse von Mutantenzelllinien im PCF Hintergrund aus.



**Abb. 21: Korrekte 3'-Prozessierung der Reportertranskripte mit mutierten 3'UTRs**

Transkriptgrößen von PCF Zelllinien mit *EP1* 3'UTR-Mutationen nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel (2% w/v). Gemessene (M) und erwartete (E) Längen der Amplikons (ohne Berücksichtigung des Poly-A Schwanzes), sowie deren Differenz ( $\Delta$ ) sind angegeben. Im Bereich von 100 bis 3000 bp wurden keine weiteren Banden festgestellt. Die automatische Detektion und Größenbestimmung erfolgte mit dem Programm Quantity One. Mit Ausnahme der Mutante  $\Delta$ LII+IV+IGR $\Delta$ 1-274 die als Negativkontrolle diente, wurde die Verwendung der erwarteten 3'-Spleißstellen verifiziert. Bei den vier größten Deletionen wurden jeweils mehr als ein RACE PCR-Produkt detektiert, wobei das kleinste (mit Stern markiert) der erwarteten Größe entsprach. Ein Southern Blot verifizierte die Spezifität der PCR-Produkte (siehe elektronischer Anhang 6.7). Im Weiteren wurden nur die drei 16mer Inversionen inv 208-217, inv 208-212 und inv 213-217 untersucht.

Die Mutation  $\Delta\text{LII}+\text{IV}+\text{IGR}\Delta 1-274$  diene als Negativkontrolle, bei der neben Teilen der Prozyklin 3'UTR auch die ersten 274 Nukleotide der IGR deletiert wurden. Durch RACE PCR konnte gezeigt werden, dass bei dieser Zelllinie erwartungsgemäß eine andere Spleißstelle verwendet wird. Dadurch entsteht ein alternatives, 227 nt längeres Transkript. Die RACE PCR Produkte aller anderen Deletionskonstrukte, sowie des WT, zeigten die erwarteten Längen der Amplifikate (siehe Abb. 21). Geringe Abweichungen sind durch die technischen Limitierungen der Agarosegel-Elektrophorese bedingt. Exemplarisch wurde das RACE PCR Produkt mit der  $\Delta\text{LII}$  m 185-187 Mutation in den pBluescript II SK(-) Vektor ligiert (siehe 2.1.4), in *E. coli* amplifiziert und anschließend sequenziert. Zwei unabhängige Klone bestätigten die korrekte Sequenz, sowie das erwartete 3'-Ende und validierten so die Größenabschätzung (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.10.2 Sekundärstrukturen mutierter 3'UTRs

Für die WT *EP1* 3'UTR wurde bereits eine berechnete Sekundärstruktur biochemisch validiert (Drozd und Clayton 1999) (siehe Abb. 8). Diese diene als Vorlage für den Vergleich der mit dem Programm RNA mfold analog berechneten, theoretischen Sekundärstrukturen aller in dieser Arbeit durchgeführten 3'UTR-Mutationen. Bei der Planung wurde darauf geachtet, in den verbleibenden 3'UTR-Bereichen möglichst keine Änderung der Sekundärstruktur hervorzurufen.

Es war bekannt, dass die Loops I und III relativ unabhängige Teilstrukturen bilden (Drozd und Clayton 1999). Die hier durchgeführten Berechnungen zeigen zudem, dass der Loop IV (nt 264-279) ebenfalls eine Einheit mit stabiler Sekundärstruktur darstellt. In fast allen durchgeführten Berechnungen kann eine sehr hohe Übereinstimmung zu der biochemisch validierten Faltung der *EP1* 3'UTR festgestellt werden. Dies ist unabhängig von zusätzlichen Mutationen in anderen Bereichen der 3'UTR (siehe Tab. 2). Im Gegensatz dazu liegt Loop II größtenteils als einzelsträngige RNA vor, was erwartungsgemäß bei den verschiedenen Mutationen variablere Strukturen zur Folge hat. Für die Berechnung der in Tab. 2 zusammengefassten, theoretischen Sekundärstrukturen wurden die Temperatur (25 °C), sowie andere Parameter von Drozd und Clayton (1999) übernommen, bzw. wenn nötig an die jeweilige Mutationen angepasst. Analoge Berechnungen wurden auch für die anderen Inkubationstemperaturen durchgeführt. Nach Erhöhung der zugrunde gelegten Temperatur auf 27 °C, was der Kultivierungstemperatur von PCF entspricht, wurden im Vergleich zu den Ergebnissen bei 25 °C nur vereinzelt Veränderungen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Meist änderte sich nur der Wert für die freien Energie  $\Delta G$ . Die Berechnungen der Sekundärstrukturen der WT 3'UTR bei 37 °C bzw. 20 °C [mit- und ohne Berücksichtigung der Parameter von Drozd und Clayton (1999)] ließen keine temperaturabhängigen Faltungsunterschiede (wie sie bei RNA-Thermometern beschrieben sind) erkennen. Die Faltungen einiger Haarnadelschleifen [nt1-102, nt 196-230, nt 264-297 (=Loop IV)], die den überwiegenden Teil der 3'UTR repräsentieren, erwiesen sich in den meisten Berechnungen als identisch. Eine Übersicht der Sekundärstrukturen bei verschiedenen Temperaturen befindet sich im elektronischen

Anhang (siehe 6.7). Die deutlichsten Unterschiede waren in den Strukturen des Loops II erkennbar. Für diesen größtenteils einzelsträngig vorliegenden Teilbereich wurde bereits experimentell eine hohe Strukturvariabilität gezeigt (Drozd und Clayton 1999). Nachdem für die  $\Delta$ LII Mutante noch Kälteschockinduktion gezeigt werden konnte (Engstler und Boshart 2004), wird für diese Teilsequenz ein Effekt ähnlich dem von RNA-Thermometern ausgeschlossen.

3'UTR	Struktur Nr.	freie Energie $\Delta G$	Loop I (nt 1-100)	Loop II (nt 101-158)	Loop III (nt 159-263)	Loop IV (nt 264-297)
$\Delta$ I-49	1	-41,7	$\Delta$ I-49	$\pm$	$\pm$	++
	2	-41,2	$\Delta$ I-49	$\pm$	+	++
	3	-40,5	$\Delta$ I-49	+	+	++
$\Delta$ I-49 inv 208-217	1	-41,7	$\Delta$ I-49	$\pm$	+	++
	2	-41,2	$\Delta$ I-49	$\pm$	+	++
	3	-40,5	$\Delta$ I-49	-	+	++
$\Delta$ I-49+174-247	1	-27,0	$\Delta$ I-49	$\pm$	$\Delta$ 174-247	++
	2	-26,5	$\Delta$ I-49	$\pm$	$\Delta$ 174-247	++
	3	-25,8	$\Delta$ I-49	-	$\Delta$ 174-247	++
$\Delta$ I-49+LIV	1	-35,8	$\Delta$ I-49	$\pm$	+	$\Delta$ LIV
	2	-35,3	$\Delta$ I-49	$\pm$	+	$\Delta$ LIV
	3	-34,6	$\Delta$ I-49	$\pm$	+	$\Delta$ LIV
$\Delta$ I-75	1	-37,7	$\Delta$ I-75	+	+	++
	2	-37,1	$\Delta$ I-75	+	++	++
$\Delta$ I-173	1	-24,4	$\Delta$ I-173		+	++
	2	-23,4	$\Delta$ I-173		$\pm$	-
$\Delta$ I-192	1	-21,9	$\Delta$ I-192		$\pm$	++
$\Delta$ I74-247	1	-56,1	++	++	$\Delta$ 174-247	++
$\Delta$ I76-297	1	-44,9	++	$\pm$	$\Delta$ I76-297	
	2	-44,8	++	++	$\Delta$ I76-297	
	3	-43,9	++	++	$\Delta$ I76-297	
	4	-42,9	++	$\pm$	$\Delta$ I76-297	
$\Delta$ LII	1	-62,4	++	$\Delta$ LII	+	++
	2	-61,4	++	$\Delta$ LII	+	-
$\Delta$ LII inv 208-217 *	1	-62,4	++	$\Delta$ LII	$\pm$	++
	2	-61,4	++	$\Delta$ LII	$\pm$	-
	3	-60,7	++	$\Delta$ LII	$\pm$	+
$\Delta$ LII m 185-187	1	64,2	++	$\Delta$ LII	$\pm$	-
	2	-63,9	++	$\Delta$ LII	$\pm$	++
	3	-61,5	++	$\Delta$ LII	$\pm$	++
$\Delta$ LII+III	1	-44,8	++	$\Delta$ LII	$\Delta$ LIII	++
$\Delta$ LII+IV	1	-56,0	++	$\Delta$ LII	$\pm$	$\Delta$ LIV
	2	-54,9	++	$\Delta$ LII	$\pm$	$\Delta$ LIV
$\Delta$ LIV	1	-65,0	++	++	++	$\Delta$ LIV
	2	-64,5	++	++	$\pm$	$\Delta$ LIV
inv 208-217	1	-70,9	++	++	$\pm$	++
	2	-70,3	++	++	++	++
	3	-68,6	++	++	$\pm$	-
	4	-67,7	++	$\pm$	$\pm$	++
	5	-67,6	++	-	$\pm$	++
	6	-67,5	++	$\pm$	$\pm$	++
	7	-67,4	++	$\pm$	$\pm$	++
EP1 WT	1	-70,9	++	++	$\pm$	++
	2	-70,2	++	++	++	++
	3	-68,6	++	++	$\pm$	-
	4	-67,6	++	-	$\pm$	++
	5	-67,5	++	$\pm$	$\pm$	++
GPEET	6	-67,4	++	$\pm$	$\pm$	++
	1	-74,0	+	-	$\pm$	++
	2	-73,2	-	-	$\pm$	++
	3	-72,3	$\pm$	-	$\pm$	-
	4	-72,3	$\pm$	-	$\pm$	++
	5	-72,0	+	-	+	++
	6	-71,3	$\pm$	-	$\pm$	++
	7	-70,9	-	-	$\pm$	++
	8	-70,4	-	-	$\pm$	++
	9	-70,3	-	-	$\pm$	++

Tab. 2: Übersicht der Sekundärstruktur-Ähnlichkeiten von 3'UTR Mutanten

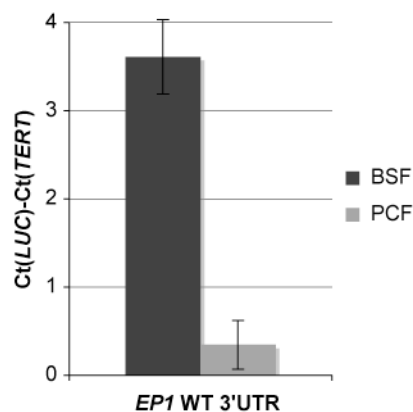
3'UTR-Strukturen wurden mit dem Programm mfold unter Berücksichtigung der an die Mutationen angepassten Parameter von Drozd und Clayton (1999) berechnet (siehe 6.4) und mit dem experimentell validierten Strukturmodell des WT (rot eingerahmt, siehe auch Abb. 8) verglichen. (\*) Verschiedene 16mer-Inversionen (inv 208-217, inv 208-212, inv 210-215 und inv 213-217) im  $\Delta$ LII Hintergrund zeigten ähnliche Ergebnisse. Ein Strukturalignment aller 3'UTR Mutanten befindet sich im elektronischen Anhang (siehe 6.7). Übereinstimmungen: ++ sehr hoch; + hoch;  $\pm$  teilweise; - keine.

### 3.2.11 Effekte der 3'UTR-Mutationen auf die Genexpression

#### 3.2.11.1 Linearität des Real Time PCR-Assays

In dieser Arbeit wurden neben der Luciferaseaktivität in allen Zelllinien parallel auch die mRNA-Mengen verglichen. Aufgrund des geringen Prozyklin mRNA-Niveaus in BSF, ist hierfür eine sensitive Methode zum Nachweis essenziell. Gleichzeitig macht die im Vergleich dazu extrem starke Expression in PCF einen großen linear-dynamischen Messbereich erforderlich. Durch quantitative Real Time PCR mit Detektion über TaqMan Sonden konnten diese Voraussetzungen erfüllt werden. In Vorexperimenten wurde nach Optimierung der Reaktionsbedingungen mit einer cDNA Verdünnungsreihe die Linearität der *LUC* (Reportergen) und *TERT* (Referenzgen) Real Time PCR-Assays über elf PCR Zyklen (entspricht >1000-fachem cDNA Unterschied) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Alle Ct-Werte von anschließend getesteten Zelllinien befanden sich in diesem linearen Bereich. Mit dem Programm LinRegPCR (Ramakers et al. 2003; Ruijter et al. 2009) wurden zusätzlich die PCR Effizienzen kontrolliert (*LUC*: 97%; *TERT*: 92%).

#### 3.2.11.2 Biologische Variation des Real Time PCR-Assays



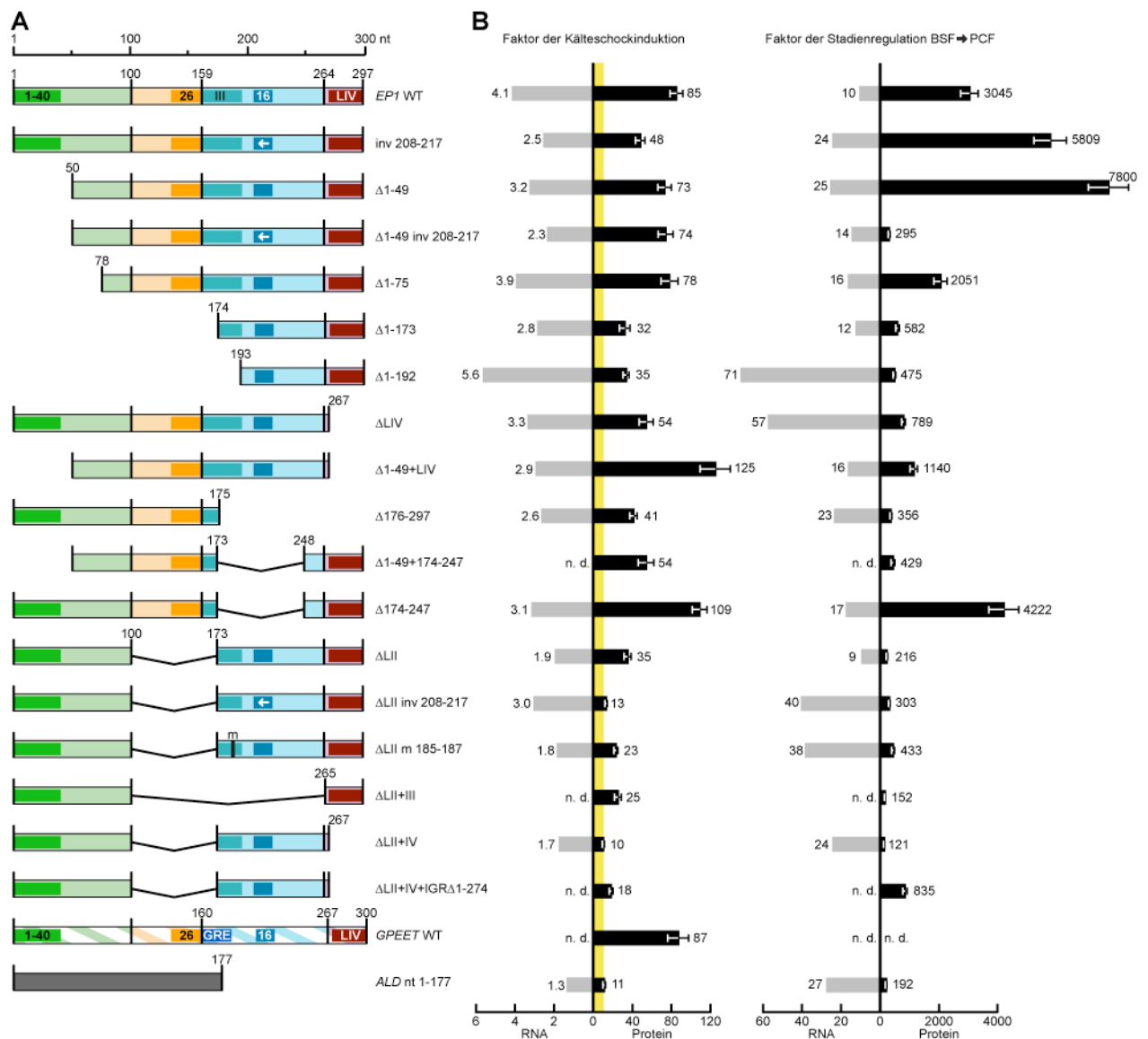
**Abb. 22: Biologische Variation des Real Time PCR-Assays**

Dargestellt sind die gemittelten  $\Delta C_t$ -Werte von acht unabhängigen biologischen Replikaten.

Die biologisch bedingten Unterschiede in der mRNA Menge wurden für BSF und PCF mit WT *EP1* 3'UTR untersucht. Logarithmisch wachsende Zellsuspensionen wurden dazu jeweils in acht unabhängige Kulturflaschen aufgeteilt und für vier Tage separat inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus diesen biologischen Replikaten extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abb. 22 zusammengefasst. Wie in 3.2.5 gezeigt wurde, ist die Expression des *TERT* Referenzgens innerhalb der untersuchten Konditionen konstant. Die Differenzen der Ct-Werte ( $\Delta C_t = C_t(LUC) - C_t(TERT)$ ) stellen somit die auf das Referenzgen normierten, relativen Expressionsunterschiede dar. Weil stärkere Genexpression zu schnellerem Erreichen des Real Time PCR-Schwellenwertes und demzufolge zu geringeren Ct-Werten führt, ist  $\Delta C_t$  bei PCF ( $0,34 \pm 0,28$ ) erwartungsgemäß geringer als bei BSF ( $3,61 \pm 0,42$ ). Nach Pfaffl (2001) ergibt sich aus den  $\Delta C_t$ -Werten dieses Experiments für die Reporterzelllinien mit WT 3'UTR ein 9,6-facher Expressionsunterschied zwischen BSF und PCF [siehe auch Abb. 23 (B)].

### 3.2.11.3 Kälteschockinduktion stellt einen Teil der Stadienregulation dar

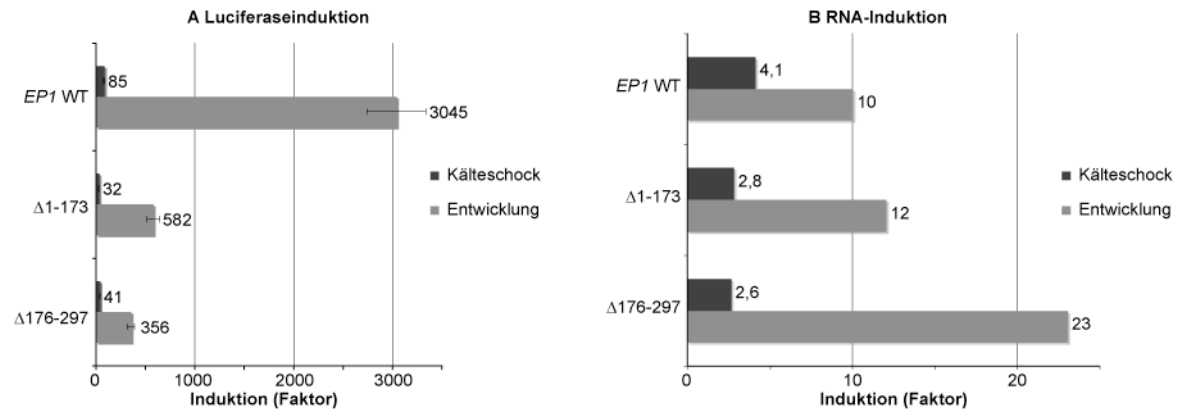
Es ist deutlich erkennbar, dass die Expressionen aller getesteten 3'UTR-Mutanten sowohl durch Kälteschock, als auch durch Entwicklung zu PCF induziert werden [siehe Abb. 23 (B)]. Bei mRNA-Menge sowie Reporterexpression stellt die Kälteschockinduktion jedoch immer nur einen Teil der stadienspezifischen Gesamtregulation dar. Der Effekt auf die Reporterexpression ist für alle 3'UTR-Mutanten jedoch deutlich stärker, als die Induktion auf mRNA-Ebene. Die maximale mRNA-Induktion nach Kälteschock ist lediglich 5,6-fach ( $\Delta 1-192$ ), während die Reporterexpression bis zu 125-fach ansteigt ( $\Delta 1-49+\text{LIV}$ ). Die tatsächlich durch die Entwicklung vermittelte mRNA-Induktion wird in dieser Analyse jedoch möglicherweise unterschätzt (siehe 3.2.6).



**Abb. 23: Zusammenfassung der Analyse von Prozyklin 3'UTR-Mutanten**

(A) EP1 3'UTR-Mutationen wie in Abb. 20 gezeigt. (B) Induktionen der Reporter-mRNA (grau) bzw. -Aktivität (schwarz) von 3'UTR-Mutanten durch Kälteschock (Verhältnis BSF 16 h 20 °C/BSF 37 °C) bzw. Stadienentwicklung (Verhältnis PCF/BSF 37 °C). Verschiedene partielle Inversionen des 16mers (inv 208-217, inv 208-212, inv 213-217) im  $\Delta \text{LII}$  Hintergrund führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Die mRNA wurde im Duplikat mit vergleichbaren Ergebnissen quantifiziert (siehe 6.3). Die Luciferaseaktivität wurde in 4-6 Replikaten gemessen. Standardfehler wurden mit der „propagation of error“ Methode (siehe 6.5) berechnet. Der globale Effekt der Kälteschockinduktion (gelb) der trunkierten Aldolase 3'UTR [in vergleichbarer Höhe auch beobachtet mit Aktin- und Tubulin 3'UTRs (Engstler und Boshart 2004)], wurde nicht von der prozyklinspezifischen Induktion abgezogen.

### 3.2.11.4 Kälteschockregulation über mehr als ein 3'UTR-Element



**Abb. 24: Induktion nach Deletion der ersten- oder zweiten Hälfte der *EP1* 3'UTR**

Vergleich der Reporter- (A) bzw. mRNA-Expression (B) von Zelllinien mit Deletion der ersten- (nt 1-173) oder zweiten (nt 176-297) Hälfte der *EP1* 3'UTR. Dargestellt sind die durch Kälteschock (16 h 20 °C) bzw. Entwicklung zu PCF vermittelten Induktionen. Die Reporterexpression wurde in 4-6 unabhängigen Experimenten gemessen. Die mRNA-Quantifizierung wurde im Duplikat durchgeführt (siehe 6.3).

Da nach Deletion der nt 1-164 oder nt 101-173 durch Kälteschockinduktion noch immer eine starke Zunahme der Reporterprotein-Expression gemessen werden konnte, wurde die spezifisch auf Kälteschock reagierende Sequenz im verbleibenden Teil (nt 174-297) der 3'UTR postuliert (Engstler und Boshart 2004). Diese Annahme wird durch die in Abb. 24 zusammengefassten Ergebnisse klar widerlegt. Sowohl nach Deletion der ersten Hälfte der 3'UTR ( $\Delta 1-173$ ), als auch nach Deletion des Sequenzbereiches in dem zunächst das kälteschocksensitive Element angenommen wurde ( $\Delta 176-297$ ), wird die mRNA-, sowie die Luciferaseexpression sowohl durch Kälteschock, als auch stadienspezifisch deutlich induziert. Demzufolge wird ein komplexer Regulationsmechanismus angenommen, an dem möglicherweise mehrere Elemente auf redundante Weise beteiligt sind.

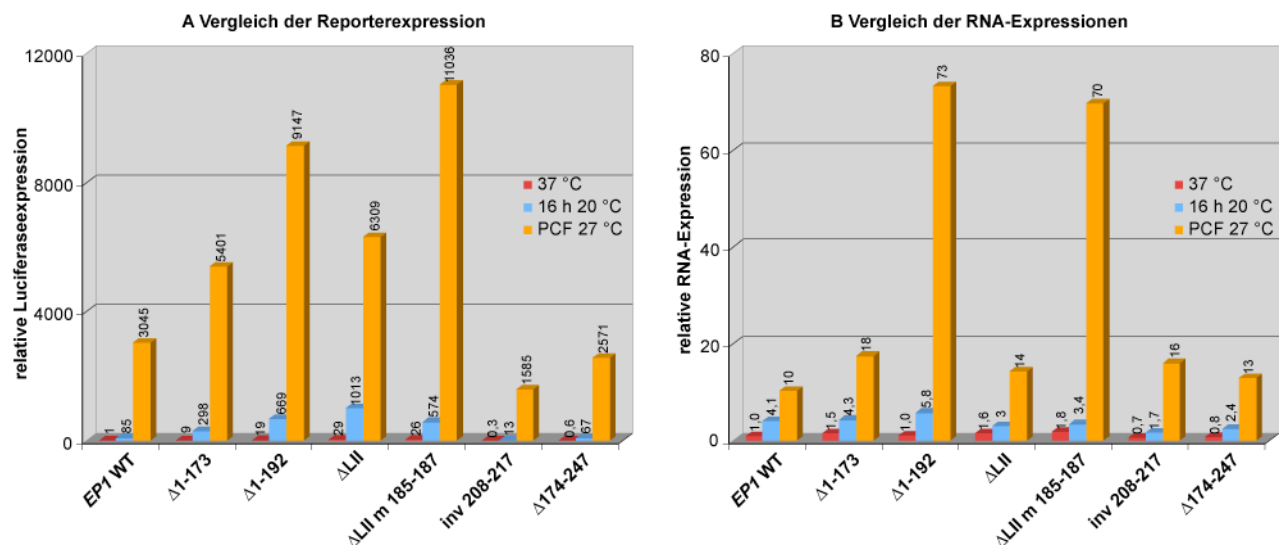
### 3.2.11.5 Homologie zu CSD-Protein Bindemotiv in der *EP1* 3'UTR

Innerhalb der *EP1* 3'UTR konnte eine Sequenz (nt 181-193) identifiziert werden (Engstler und Boshart, unpublizierte Daten), die starke Homologie zum Konsensusmotiv [GCC ANA C(/A)C AC(/U) CGC] von RNA-bindenden Proteinen mit Cold Shock Domäne aufweist (Manival et al. 2001). Es gab bereits Hinweise dafür, dass in diesem Bereich [nt 159-197 (Hotz et al. 1997) bzw. nt 171-191 (Wilson et al. 1999)] in BSF ein negatives Element enthalten ist. Um zu klären, welchen Einfluss diese Teilsequenz auf die mRNA- bzw. Proteinexpression hat, wurden mehrere 3'UTR-Mutanten untersucht. Weiterhin wurden Kandidatenproteine mit CSD-Sequenzen aus der *T. brucei* Genomdatenbank identifiziert und ihr Einfluss auf die Regulation der Prozyklinexpression untersucht (siehe 3.4.4).

Der Vergleich der Reporterexpression von  $\Delta 1-173$  und  $\Delta 1-192$  Mutanten bestätigt die Existenz eines negativen Elements im Bereich der nt 174-192. Die absolute Expression der Zelllinie mit  $\Delta 1-192$  Mutation ist gegenüber der  $\Delta 1-173$  Mutante erhöht. Der Effekt dieses Elements (nt 174-192) ist nicht auf BSF beschränkt, sondern wurde auch in PCF festgestellt [siehe Abb. 25 (A)]. Er ist zudem nicht abhängig vom 26mer (nt 134-159), das in beiden Mutationen ebenfalls deletiert ist.

Die Unterschiede zur Reporterexpression der  $\Delta$ LII Mutante sind auf die zusätzlichen Deletionen zurückzuführen. Der direkte Vergleich der  $\Delta$ 1-173 und  $\Delta$ 1-192 Mutanten nach Kälteschock zeigt außerdem, dass die Induktion beider Mutationen gleich groß ist (etwa 33-fach). Ein kälteschockspezifisches Regulationselement in dieser Teilsequenz der *EP1* 3'UTR ist demzufolge unwahrscheinlich.

Ein Teil der postulierten CSD-Protein Bindestelle bildet einen einzelsträngigen Bereich in der Sekundärstruktur, des sonst zum großen Teil als Doppelstrang vorliegenden Loop III. Da Proteine meist an einzelsträngige RNA-Bereiche binden, wurde im  $\Delta$ LII Hintergrund durch Punktmutation von nur drei Nukleotiden (AAC zu CTG) spezifisch dieser Bereich verändert (Mutation  $\Delta$ LII m 185-187). Die Mutation wurde so gewählt, dass die Struktur in diesem Bereich trotz Sequenzveränderung erhalten bleibt. Im Vergleich zur Zelllinie mit  $\Delta$ LII Mutation ist die Induktion von BSF durch Kälteschock leicht reduziert (23-fach statt 35-fach). Interessanterweise steigt die Luciferaseexpression in PCF sogar an. Dies stimmt mit der oben beschriebenen Beobachtung überein, dass sich im Bereich der nt 174-192 ein negatives Element befindet.



**Abb. 25: Effekte des negativen Elementes in Loop III**

Effekte von 3'UTR-Mutationen auf die Reporter- (A) bzw. mRNA-Expression (B) bei verschiedenen Konditionen [BSF 37 °C (rot), BSF 16 h 20 °C (blau); PCF 27 °C (orange)]. Die Expression der Zelllinie mit *EP1* WT 3'UTR bei 37 °C wurde auf 1 festgesetzt.

Die mRNA-Expression in PCF steigt bei der  $\Delta$ 1-192 Deletion gegenüber der  $\Delta$ 1-173 Mutante auffallend stark an [siehe Abb. 25 (B)]. Der beobachtete Effekt ist beim Vergleich von Zelllinien mit alternativen Mutationen in diesem 3'UTR-Bereich ( $\Delta$ LII m 185-187 und  $\Delta$ LII) analog. In beiden Fällen sind in entsprechenden BSF Konditionen nur geringe Unterschiede festzustellen. Dass diese auf mRNA-Ebene festgestellten Effekte nicht in gleicher Deutlichkeit auch bei der Luciferaseaktivität auftreten, ist auf zusätzliche Regulationsmechanismen zurückzuführen. Da diese Mutationen in PCF die stärksten in dieser Arbeit gemessenen Reporterexpressionen aufweisen [3,0-fach ( $\Delta$ 1-192) bzw. 3,6-fach ( $\Delta$ LII m 185-187) mehr als der WT], ist vorstellbar, dass die maximale Proteinexpression in der Zelle hier limitiert ist.



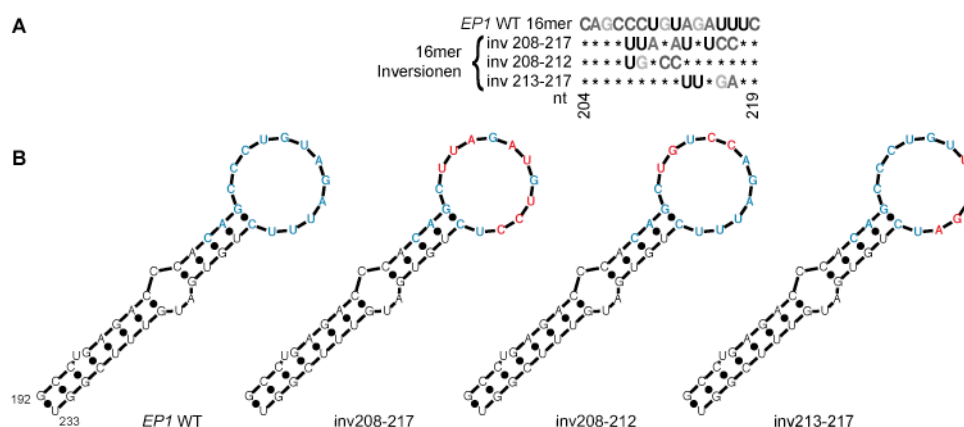
Weil in den oben aufgeführten Mutationen jeweils auch der Loop II fehlt, wurde durch die Mutation  $\Delta 174-247$  ausgeschlossen, dass die beschriebenen Effekte nur bei Kombination dieser beiden Elemente entstehen. Im Vergleich mit dem WT sind bei  $\Delta 174-247$  in allen drei untersuchten Konditionen nur geringe Änderungen der Reporterexpressionen festzustellen. Bei Gegenüberstellung mit der inv 208-217 Mutation fällt in allen Konditionen ein leichter Anstieg der Luciferaseexpression auf, der ebenfalls auf ein negatives Element im Bereich der nt 174-247 schließen lässt. Die Reduktion der Reporterexpression, die durch Mutation des 16mers (positives Element) entsteht, wird durch Entfernung des negativen Elements ( $\Delta 174-247$ ) aufgehoben. Die resultierenden Expressionsniveaus entsprechen deshalb in etwa dem WT.

Diese Ergebnisse können folgendermaßen zusammengefasst werden: Verschiedene Mutationen im Bereich der 3'UTR, der einem Konsenselement für RNA-bindende CSD-Proteine ähnelt (nt 181-193), zeigen keinen oder nur geringen Einfluss auf die Induzierbarkeit der Luciferaseaktivität durch Kälteschock. Die mRNA-Expression ändert sich in den Mutanten  $\Delta 1-192$  und  $\Delta \text{LII}$  m 185-187, im Vergleich zu  $\Delta 1-173$  bzw.  $\Delta \text{LII}$  in den beiden BSF-Konditionen nur geringfügig.

Die Quantifizierung von mRNA- und Luciferaseaktivität der getesteten Zelllinien zeigt, dass sich im Bereich der nt 174-192 ein negatives Element befindet. Auch durch die  $\Delta 174-247$  Mutation konnte ein negatives Element gezeigt werden. Möglicherweise ist dieses mit dem oben beschriebenen identisch, oder ein Teil davon. Die aus der Mutation des 16mers (positives Element) resultierende Reduktion der Reporterexpression kann durch Deletion dieses negativen Elements in allen getesteten Konditionen ausgeglichen werden. Der Effekt des negativen Elements in Loop III ist demnach sowohl unabhängig von Loop II (siehe oben) als auch vom 16mer.

### 3.2.11.6 Strukturkonservative Sequenzveränderungen zerstören das 16mer

Um den Effekt des 16mers auf die Kälteschockregulation zu untersuchen, wurden Inversionsmutationen im WT- oder  $\Delta \text{LII}$ -Hintergrund untersucht. Im Gegensatz zur vollständigen Entfernung des 16mers, (Schurch et al. 1997) wurde durch die verschiedenen Inversionen die berechnete Sekundärstruktur der 3'UTR durch diese Mutation nicht verändert (siehe Abb. 26).



**Abb. 26: Übersicht der 16mer-Inversionen**

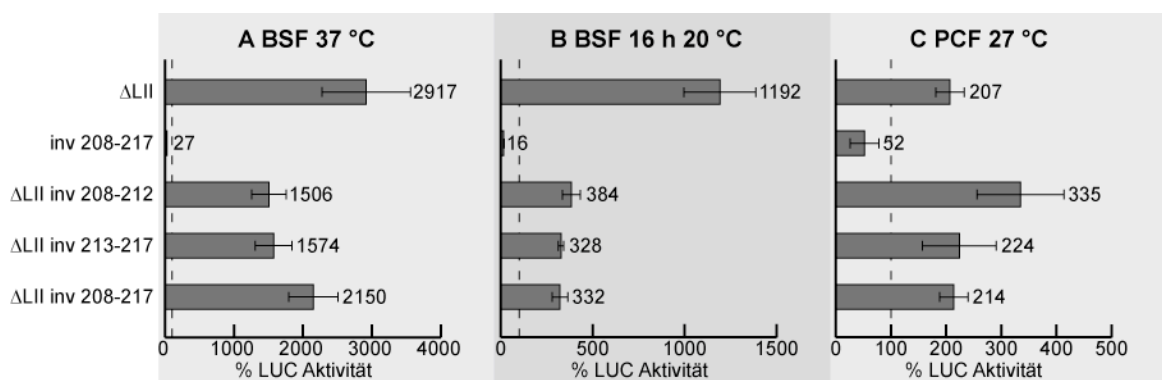
(A) Sequenzvergleich von 16mer und Inversionsmutationen. Übereinstimmungen mit dem WT sind durch Sterne gekennzeichnet. Die Nummerierung der nt bezieht sich auf die WT EP1 3'UTR. (B) Gegenüberstellung der Sekundärstrukturen nach Inversion des 16mers (blau). Mutierte Bereiche sind rot hervorgehoben.

Die Inversion einer Teilsequenz (inv 208-217) des 16mers, das in PCF (Hehl und Roditi 1994) und BSF (Schurch et al. 1997) als positives Element beschrieben ist, reduziert im Vergleich zum WT die Reporterexpression in allen drei Konditionen (siehe Abb. 27). Der in dieser Arbeit gemessene, zweifache Effekt im Vergleich zum WT in PCF entspricht der kompletten Inversion des 16mers (Hehl et al. 1994). Nach Deletion des 16mers (Schurch et al. 1997) wurde eine zehnfache Reduktion festgestellt. Die dabei hervorgerufenen Sekundärstruktur-Veränderungen führen wahrscheinlich zur Addition mehrerer Effekte, die nicht ausschließlich auf das 16mer zurückgeführt werden können.

Durch Deletion und Rekonstitution mit (invertierten) Sequenzen wurde gezeigt, dass die Sequenz und Struktur des 16mers die Expression der Prozyklinexpression in PCF beeinflussen (Hehl et al. 1994). Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigen, dass bereits die minimale Veränderung von Teilsequenzen bei gleichbleibender Struktur zur Zerstörung des 16mers führt (siehe Abb. 27).

### 3.2.11.7 Das 16mer ist nur in BSF unabhängig vom 26mer

Das 16mer ist ein positives Element, das fast ausschließlich auf Translationsebene wirkt (Hehl et al. 1994). Durch Mutation wird die Luciferaseexpression in allen drei Konditionen reduziert. Das 26mer ist ein negatives Element in Loop II, dessen Deletion in allen Konditionen zu einem Ansteigen der Reporterexpression führt. Für PCF zeigten Furger et al. (1997), dass 16mer und 26mer nicht unabhängig voneinander wirken. Nach Deletion des 26mers, hat die zusätzliche Mutation des 16mers keinen weiteren Effekt mehr. Dementsprechend wurde die „Antirepressortheorie“ formuliert, nach der das 16mer in PCF keinen unabhängigen Aktivator darstellt, sondern induzierend wirkt, indem es das negative 26mer (den Repressor) reprimiert. In BSF wurde dieser Effekt von Hotz et al. (1997) mit leicht abweichenden  $\Delta 26mer$   $\Delta 16mer$  Doppelmutanten nicht beobachtet. In dieser Arbeit wurden entsprechende und direkt vergleichbare Mutationen in BSF- und PCF erstmals gleichzeitig gegenübergestellt, um diese Diskrepanz aufzuklären. Die zunächst widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse für BSF und PCF konnten jeweils reproduziert werden.



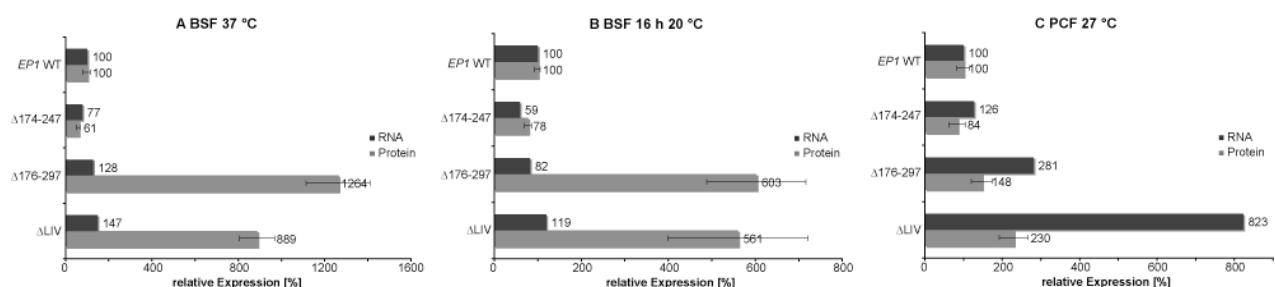
**Abb. 27: Stadienspezifische Interaktion von 26mer und 16mer**

Luciferaseaktivität von Zelllinien mit Mutationen in Loop II, 16mer oder Loop II und 16mer. Die Expression der Zelllinie mit *EP1* WT 3'UTR wurde in jeder Kondition [(A) BSF 37 °C; (B) BSF 16 h 20 °C; (C) PCF 27 °C] auf 100% festgesetzt (gestrichelte Linie). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4-6 unabhängigen Experimenten.

Die Reporterexpression von drei Zelllinien, bei denen der Loop II deletiert- und gleichzeitig das 16mer durch verschiedene Inversionen mutiert wurde, ist in PCF im Vergleich zu der  $\Delta$ LII Mutante unverändert. Im Gegensatz dazu konnten bei BSF, sowie bei kälteschockinduzierten BSF eindeutig unabhängige Effekte für den Loop II und das 16mer nachgewiesen werden. Hier werden durch die verschiedenen 16mer-Inversionen übereinstimmend die Luciferaseexpression deutlich reduziert (siehe Abb. 27). Es gibt also stadienspezifische Unterschiede im Zusammenwirken von 16mer und 26mer. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind unklar. Die Beobachtungen passen jedoch zu dem von Roditi et al. (1998) vorgeschlagenen Modell, nach dem die Prozyklin mRNA in zwei Konformationen vorliegen kann. In BSF überwiegt demnach die unstabilere Form, während sich das Gleichgewicht bei der Differenzierung zu PCF rasch zur stabileren- und effizienter translatierten Form verschiebt. Somit wären unterschiedliche Elemente für (de-) stabilisierende Proteine zugänglich. In der stabileren Form könnten Proteine an die positiven Elemente binden und so die Degradierung der mRNA verhindern, die ohne diese Stabilisierung rasch abgebaut wird.

### 3.2.11.8 Loop IV: ein neues regulatorisches *cis*-Element

Die durch *EP1*- bzw. *GPEET* 3'UTR vermittelten Kälteschockinduktionen sind in ihrer Höhe fast identisch (siehe 3.2.8). Die berechneten Sekundärstrukturen dieser Sequenzen wurden in dieser Arbeit detailliert verglichen. Neben den bereits durch Hotz et al. (1997) beschriebenen Elementen 16mer und 26mer konnte ein zusätzlicher Bereich identifiziert werden, der sowohl in Sequenz als auch Sekundärstruktur vollständig übereinstimmt. Diese Teilsequenz wurde in keiner bisher erschienenen Arbeit näher untersucht. Die Publikation zur biochemisch validierten Sekundärstruktur der *EP1* 3'UTR (Drozd und Clayton 1999) beschreibt ebenfalls nur die Loops I bis III. Die Sekundärstruktur in diesem Loop IV (nt 264-297) genannten Abschnitt, blieb bei den Berechnungen unabhängig von der angegebenen Temperatur (20 °C, 25 °C, 37 °C) stets erhalten. Ferner erwies sich die Faltung von Loop IV auch als unabhängig von Mutationen in anderen 3'UTR-Bereichen (siehe 3.2.10.2). Der Einfluss von Loop IV auf die Regulation der Prozyklinexpression wurde deshalb genauer untersucht. Durch Deletion dieser Sequenz (Mutante  $\Delta$ LIV) verändert sich weder die 3'-Prozessierung noch die Sekundärstruktur der verbleibenden 3'UTR (siehe 3.2.10.1 bzw. 3.2.10.2).



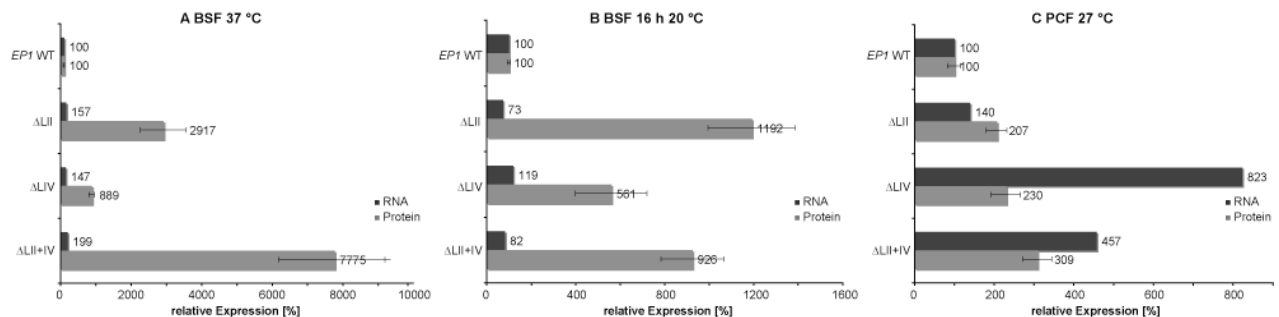
**Abb. 28: Negatives regulatorisches Element in Loop IV**

mRNA- und Luciferaseexpression von Zelllinien mit den 3'UTR-Mutationen  $\Delta$ 174-247,  $\Delta$ 176-297 und  $\Delta$ LIV. Die Expressionen der Zelllinie mit *EP1* WT 3'UTR wurden in jeder Kondition [(A) BSF 37 °C; (B) BSF 16 h 20 °C; (C) PCF 27 °C] auf 100% festgesetzt. Die Reporterexpression wurde in 4-6 unabhängigen Experimenten gemessen. Die mRNA-Quantifizierung wurde im Duplikat durchgeführt (siehe 6.3).

Die Deletion der nt 176-297 führt in allen Konditionen zur erhöhten Reporterexpression. In dieser Mutante fehlt neben Loop IV allerdings auch der größte Teil des Loop III, inklusive der Sequenz mit Homologie zum CSD-Protein Bindemotiv und dem 16mer. Der Vergleich mit der Reporterexpression der  $\Delta 174-247$  Mutante zeigt, dass der Anstieg durch die Entfernung eines negativen Elements im Bereich 248-297 hervorgerufen wird. Die Deletion von Loop IV (nt 268-297) hat in allen untersuchten Konditionen vergleichbare Effekte (siehe Abb. 28) und grenzt dieses Element somit auf 30 nt ein. Wie auch bei Loop II ist der Effekt in den Konditionen mit ohnehin erhöhter Expression (BSF 20°C, PCF) geringer. Durch Vergleich der Mutationen  $\Delta 174-247$  und  $\Delta 176-297$  wird deutlich, dass Loop IV unabhängig von den regulatorischen Elementen in Loop III ist.

Im Gegensatz zu der einheitlichen Induktion der Luciferaseexpression innerhalb der drei dargestellten Konditionen, gibt es Unterschiede bei den Effekten dieses negativen Elements auf die mRNA. Obwohl die Reporterexpression durch Deletion von Loop IV in BSF  $\pm$  Kälteschock sehr deutlich ansteigt, werden in diesen Konditionen nur geringe Anstiege der mRNA-Niveaus festgestellt. In PCF hat die Deletion des Loop IV auf den Reporter hingegen einen geringeren Effekt als in BSF, während die Unterschiede auf mRNA-Ebene sehr viel größer sind. Mit 823% zeigt die  $\Delta$ LIV Mutante in PCF die höchste mRNA-Expression aller getesteten Mutanten. Möglicherweise ist die Proteinsynthese hier limitierend.

### 3.2.11.9 Stadienspezifische Interaktionen von Loop II und Loop IV



**Abb. 29: Stadienspezifische Interaktion von Loop II und Loop IV**

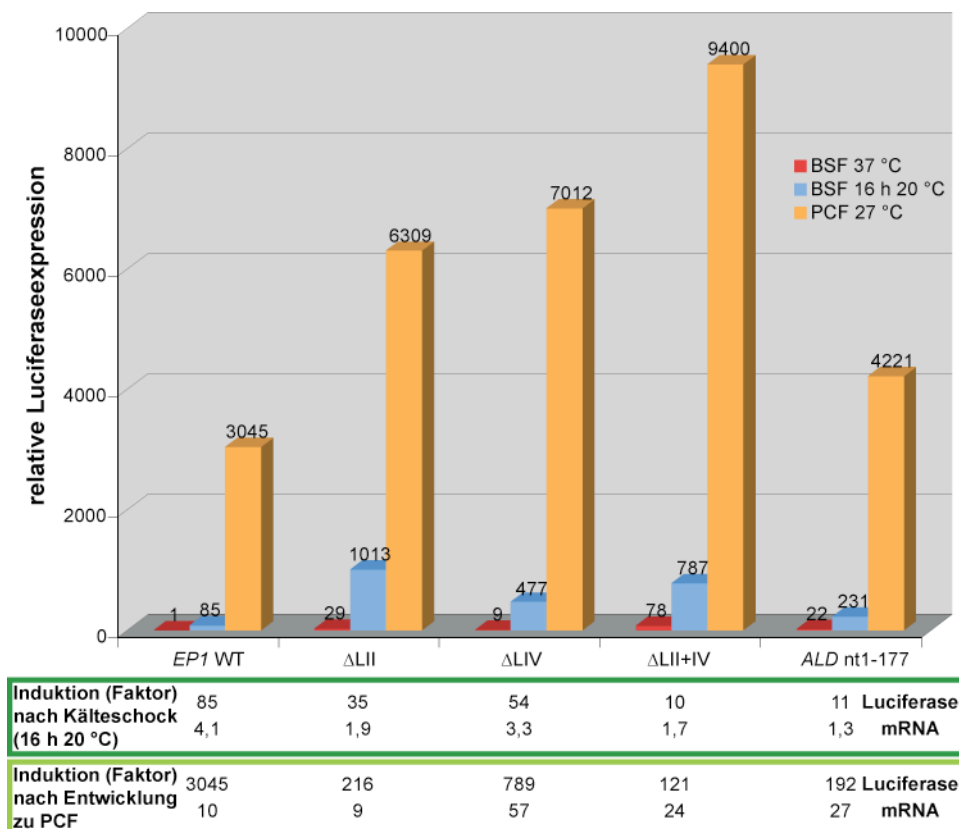
mRNA- und Luciferaseexpression von Zelllinien mit Mutationen in Loop II, Loop IV oder Loop II+IV. Die Expressionen der Zelllinie mit *EP1* WT 3'UTR wurden in jeder Kondition [(A) BSF 37 °C; (B) BSF 16 h 20 °C; (C) PCF 27 °C] auf 100% festgesetzt. Die Reporterexpression wurde in 4-6 unabhängigen Experimenten gemessen. Die mRNA-Quantifizierung wurde im Duplikat durchgeführt (siehe 6.3).

Neben dem in dieser Arbeit identifizierten Loop IV ist das 26mer (Hotz et al. 1997) ein weiteres negatives 3'UTR-Element. In Abb. 29 sind zum Vergleich die mRNA- und Proteinexpressionen von  $\Delta$ LII und  $\Delta$ LIV Mutanten dargestellt. In der  $\Delta$ LII Mutante ist auch ein Teil des Loops III (nt 160-171) deletiert, der ein negatives Element enthält (siehe Abb. 23). Dennoch wurde die ursprüngliche Bezeichnung (Furger et al. 1997) beibehalten, um Konsistenz zu bisherigen Arbeiten zu wahren. Sowohl die  $\Delta$ LII als auch die  $\Delta$ LIV Deletion führt zu erhöhter Luciferaseexpression in allen drei untersuchten Konditionen. Die Ergebnisse von Furger et al. (1997) mit stabilen  $\Delta$ LII Transfektanden in PCF werden durch die dargestellten Effekte auf mRNA und Luciferase Reporter bestätigt. Beide BSF Konditionen zeigen bei der Reporterexpression deutlich größere Effekte, als auf mRNA-Ebene.

Der Effekt von Loop IV ist in PCF mit dem des Loop II vergleichbar. In BSF  $\pm$ Kälteschock ist der Anstieg der Luciferaseexpression nach Deletion von Loop II stärker. Nach Kombination beider Deletionen (Mutante  $\Delta$ LII+IV), wird vor allem auf Reporterexpression in uninduzierten BSF im Vergleich zu den Einzelmutationen nochmals eine drastische Steigerung gemessen. In dieser Kondition haben die enthaltenen drei negativen Elemente (in Loops II, III und IV) also unabhängige Effekte. Im Vergleich zu den Einzelmutationen kommt es bei der  $\Delta$ LII+IV Mutation sowohl nach Kälteschock als auch bei PCF nur zu geringfügigen Änderungen der Reporterexpression. In diesen Konditionen interagieren die negativen Elemente in irgendeiner Form. Als Konsequenz hat nach Deletion von einem der negativen 3'UTR-Elemente, die Deletion der anderen (in uninduzierten BSF unabhängigen) Elemente keinen zusätzlichen Effekt.

Der etwa 78-fache Anstieg der BSF Zelllinie mit  $\Delta$ LII+IV 3'UTR im Vergleich zum WT führt zur höchsten Luciferaseexpression aller getesteten BSF Mutanten bei 37 °C. Sie beträgt etwa 3% von WT PCF. Das entsprechende Konstrukt mit  $\Delta$ LII+IV 3'UTR ist deshalb möglicherweise auch eine interessante Alternative für die Überexpression von Proteinen in BSF.

### 3.2.11.10 Minimale Kälteschockinduktion in $\Delta$ LII+IV Mutante

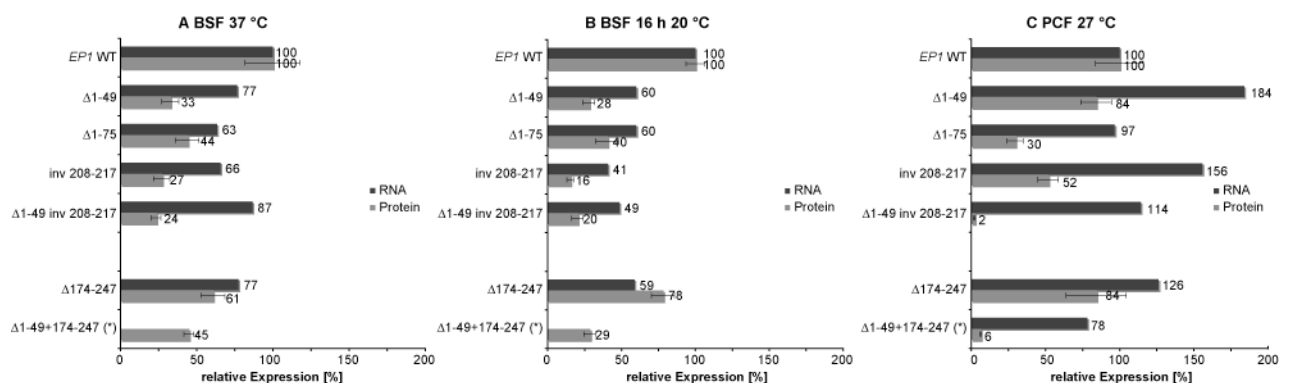


**Abb. 30: Minimale Kälteschockinduktion nach gleichzeitiger Deletion von Loop II und Loop IV**  
Relative Reporterexpression von 3'UTR-Mutanten bei verschiedenen Konditionen [BSF 37 °C (rot), BSF 16 h 20 °C (blau) und PCF 27 °C (orange)]. Die Expression der Zelllinie mit *EP1* WT 3'UTR bei 37 °C wurde auf 1 festgesetzt. Die Induktionen der Reporter- und mRNA-Expressionen nach Kälteschock bzw. Entwicklung zu PCF (siehe Abb. 23) sind zum Vergleich ebenfalls angegeben (grün eingerahmt).

Bei den oben beschriebenen Effekten der  $\Delta$ LII,  $\Delta$ LIV und  $\Delta$ LII+IV Mutationen wurden stets Änderungen im Vergleich zur Expression des WT angegeben. Informationen über den Effekt verschiedener 3'UTR-Mutationen auf die Kälteschockregulation erhält man durch Vergleich der Induktionsfaktoren. Eine entsprechende Auswertung der  $\Delta$ LII,  $\Delta$ LIV sowie  $\Delta$ LII+IV Mutationen ist in Abb. 30 dargestellt. Die Expression der Kontrolle mit WT 3'UTR bei 37 °C wurde auf 1 festgesetzt. Kälteschock induziert die Luciferaseexpression des WT 85-fach. Nach Deletion des Loop II steigt die Expression bei 37 °C und bei 20 °C unterschiedlich stark an. Als Konsequenz ist die Induktion nach Kälteschock hier nur noch 35-fach. Die  $\Delta$ LIV Mutation zeigt einen 54-fachen Anstieg. Beide Mutationen sind alleine nicht in der Lage, die Induktion vollständig zu verhindern. Eine deutlich verringerte Kälteschockinduktion ist jedoch in Zellen mit  $\Delta$ LII+IV Deletion festzustellen (nur noch zehnfach). Sie ist vergleichbar mit der generellen Induktion (siehe 3.2.9), die mit verschiedenen Kontroll-3'UTRs festgestellt werden konnte [die elffache Induktion der Reporterzelllinie mit Aldolase 3'UTR (nt 1-177) ist zum Vergleich ebenfalls angegeben]. Die Regulation auf mRNA-Ebene spielt hier nur eine untergeordnete Rolle (Induktion bei der trunkierten Aldolase 3'UTR 1,3-fach und bei der  $\Delta$ LII+IV 3'UTR 1,7-fach).

Die Verringerung der Proteininduktion wird vor allem durch Derepression der Luciferaseexpression bei der  $\Delta$ LII+IV Zelllinie bei 37 °C erreicht. Dementsprechend reduziert sich auch die Induktion durch Entwicklung zu PCF in dieser Mutante besonders deutlich (WT 3045-fach,  $\Delta$ LII+IV 121-fach).

### 3.2.11.11 Stadienspezifisch kooperative Effekte der positiven Elemente



**Abb. 31: Stadienspezifisch kooperative Effekte der positiven Elemente**

mRNA- und Luciferaseexpression von Zelllinien mit Mutationen der positiven Elemente in Loop I ( $\Delta$ 1-49 bzw.  $\Delta$ 1-75), Loop III (inv 208-217 bzw.  $\Delta$ 174-247) oder Loop I und III ( $\Delta$ 1-49 inv 208-217 bzw.  $\Delta$ 1-49+174-247). Die Expressionen der Zelllinie mit EP1 WT 3'UTR wurden in jeder Kondition [(A) BSF 37 °C; (B) BSF 16 h 20 °C; (C) PCF 27 °C] auf 100% festgesetzt. Die Reporterexpression wurde in 4-6 unabhängigen Experimenten gemessen. Die mRNA-Quantifizierung wurde im Duplikat durchgeführt (siehe 6.3). Die mRNA-Expression der mit einem Stern markierten Zelllinie wurde nur in PCF gemessen.

Die Effekte der positiven Elemente 16mer und nt 1-40 sind bereits in BSF und PCF beschrieben (Hehl et al. 1994; Furger et al. 1997). In dieser Arbeit wurden diese Elemente unter Einbeziehung zusätzlicher Mutationen und Konditionen nochmals analysiert. Durch Auswahl geeigneter Mutationen sollen mögliche Veränderungen der 3'UTR-Sekundärstrukturen vermieden werden. Auch diese alternativen Mutationen zeigten die erwartete Verringerung der Expression. Die hier untersuchten 3'UTR-Sequenzen wirken in allen drei getesteten Konditionen als positive Elemente.

Die Effekte in den verschiedenen Konditionen sind sich ähnlicher, als nach Deletion der negativen Elemente. In PCF ist die Expression nach Deletion der nt 1-49 noch unerwartet hoch. Erst bei der  $\Delta 1-75$  Mutante ist die Expression deutlich reduziert. Die Unterschiede dieser beiden Mutationen in BSF  $\pm$  Kälteschock sind nur gering. Die partielle Inversion des 16mers führt im Vergleich zum WT zur Halbierung der Reporterexpression (siehe Abb. 31) und entspricht den Ergebnissen nach vollständiger Inversion des 16mers (Hehl et al. 1994). Die deutlicheren Effekte bei Furger et al. (1997) in PCF ( $\Delta 16$  bzw.  $\Delta 40$ , beide etwa 10% des WT) sind wahrscheinlich durch unbeabsichtigte Veränderungen in den Sekundärstrukturen der mutierten 3'UTR zu erklären. Diese sind bei vollständiger Deletion des 16mers zu erwarten, bzw. wurden für die  $\Delta 40$  Mutation beschrieben (Furger et al. 1997).

Für PCF wurde bereits durch die Analyse von transient transfizierten  $\Delta 40\Delta 16$ mer Doppelmutanten gezeigt, dass die beiden Elemente voneinander unabhängige Effekte auf die Reporterexpression haben (Furger et al. 1997). Dies konnte in dieser Arbeit mit stabilen Zelllinien bestätigt werden. Im Vergleich zu den Einzelmutationen  $\Delta 1-49$  (84%) bzw. inv 208-217 (52%) zeigt die  $\Delta 1-49$  inv 208-217 Doppelmutation in PCF eine stark verringerte Expression (2% des WT). Interessanterweise unterscheiden sich die Ergebnisse der beiden BSF-Konditionen hier. Die Expressionen der Doppelmutanten entsprechen hier in ihrer Höhe den Einzelmutationen.

Weitere Mutationen bestätigen diese Beobachtung. Die Deletion der nt 174-247 führt in allen drei Konditionen zu leichter Reduktion der Luciferaseexpression. Da bei dieser Deletion neben dem 16mer auch weite Teile des Loops III (inklusive dem in 3.2.11.5 beschriebenen, negativen Element) entfernt wurden, ist die Expression erwartungsgemäß höher, als bei der inv 208-217 Mutante. Die  $\Delta 1-49+174-247$  Doppelmutante zeigt in Übereinstimmung mit der oben beschriebenen  $\Delta 1-49$  inv 208-217 Doppelmutante eine deutliche, im Vergleich zu den Einzelmutationen zusätzliche, Reduktion der Reporterexpression in PCF (6% des WT). In BSF und kälteschockinduzierten BSF addieren sich die Effekte der einzelnen Mutationen nicht. Hier hat nach Mutation eines Elements die Mutation des Anderen keinen zusätzlichen Effekt. Wie bereits für Loop II und Loop IV beschrieben (siehe 3.2.11.9), gibt es demnach auch hier stadienspezifische Unterschiede im Zusammenwirken verschiedener 3'UTR-Elemente.

Die Ergebnisse aus Abb. 31 legen nahe, dass die beiden positiven Elemente in PCF redundante Funktionen haben. Dadurch hat die Mutation von lediglich einem dieser Sequenzbereiche nur geringe Auswirkungen. Erst nach Deletion beider Elemente ( $\Delta 1-49$  inv 208-217 bzw.  $\Delta 1-49+174-247$ ) sinken die Reporterexpressionen auf die geringsten Werte aller PCF Mutanten (2% bzw. 6%). Da die mRNA-Expressionen nur geringfügig von der Kontrolle mit WT 3'UTR abweichen (114% bzw. 78%), wirkt sich die Kooperation der positiven Elemente am ehesten auf Translationsebene aus.

### 3.3 Genomweite Genexpressionsanalyse

#### 3.3.1 Microarrayanalyse kälteschockinduzierter BSF

Durch globale Analyse der Expressionsänderungen mit DNA-Microarrays sollten neben Prozyklin weitere coregulierte Gene identifiziert werden. Im Rahmen einer Kooperation wurde von Susanne Diehl in der Abteilung für funktionelle Genomanalyse am DKFZ in Heidelberg zunächst ein Microarray-Vorexperiment mit vier Hybridisierungen durchgeführt, um die nach sechsständiger Kälteschockinduktion am signifikantesten regulierten Sequenzen zu identifizieren. Dabei zeigten die Prozyklinkontrollen die erwarteten Differenzwerte. Die 18 am deutlichsten induzierten Sequenzen wurden ausgewählt. Die mRNA-Expressionen von zwölf dieser Transkripte wurde durch Quantifizierung von Northern Blots durch Phosphorimaging exemplarisch bestätigt (siehe Tab. 3). Demzufolge waren Sequenzierung und Sondenherstellung für die Northern Blot Verifikation in diesem Fall nicht möglich.

Um möglichst viele Kandidatengene identifizieren zu können, wurde im folgenden Experiment die Änderung der Genexpression nach Kälteschockinduktion für 4; 8 bzw. 16 h analysiert. Durch Vergleich der 3'UTR-Sequenzen von coregulierten mRNAs sollten potentielle *cis*-Elemente identifiziert werden. Da sich durch Kälteschock auch die Sensitivität für das Differenzierungssignal Citrat erhöht (Engstler und Boshart 2004), sollten durch die Analyse der regulierten Transkripte möglicherweise auch Komponenten des Differenzierungsweges, wie beispielsweise der postulierte Citratrezeptor, identifiziert werden.

cDNA Klon	Accession Nr.	Gen	Induktionsfaktor	
			Microarray	Northern
1K24	Tb11.02.4430	hypothetisches Protein, konserviert	2,1	2,4
6M11	13J3.08	hypothetisches Protein	2,0	3,2
9K9	Tb927.6.480	EP-2 Procyclin	1,8	3,5
13E2	Tb927_09_20050117_v4	ESAG9	2,4	2,0
14C3	Tb11.02.0090	Kinesin-like Protein, putativ	1,8	2,6
14O2	Tb06.3A7.930	hypothetisches Protein, unwahrscheinlich	1,9	
18E13	Tb927.3.570	putatives ESAG	2,2	1,7
19F15	Tb927.10.12700	Pyruvat Dehydrogenase e1 Komponente Alpha Untereinheit, putativ	2,1	2,3
19P22	Tb927.10.10240	PAG1, Procyclin-assoziiertes Gen 1	1,7	
23E14	Tb11.20.0004	VSG, Pseudogene, putativ	2,4	
31A2	Tb927.7.7100	hypothetisches Protein	2,5	2,4
31J3	kein Bakterienwachstum		2,2	
32A21	Tb927_01_v3	ESAG putativ	2,2	2,5
38D10	Tb11.03.0620	RNA-bindendes Protein, putativ	1,7	2,0
38F23	Tb11.01.3110	Hitzeschock Protein 70	1,7	3,8
43F7	Tb927.4.2050	hypothetisches Protein, unwahrscheinlich	1,9	
43L18	Tb927.6.1800	Phosphatase 2C, putativ	2,0	
48A18	Tb927_01_v4	putatives ESAG3	2,4	1,8

Tab. 3: Im Microarray-Vorexperiment nach Kälteschock am deutlichsten induzierte Gene.

Die Induktionsfaktoren der Northern Blots wurden durch Phosphorimaging quantifiziert. Ein Bakterienklon (31J3) der für den Microarray verwendeten cDNA Bibliothek konnte nicht kultiviert werden.

Der Vergleich der Transkriptome der beiden stabilen Lebensstadien BSF und PCF zeigte, dass etwa 2% der detektierbaren mRNAs differenziell reguliert sind (Diehl et al. 2002; Brems et al. 2005). Microarrayanalysen bei *T. cruzi* (Minning et al. 2003) bzw. *L. major* (Akopyants et al. 2004) zeigten

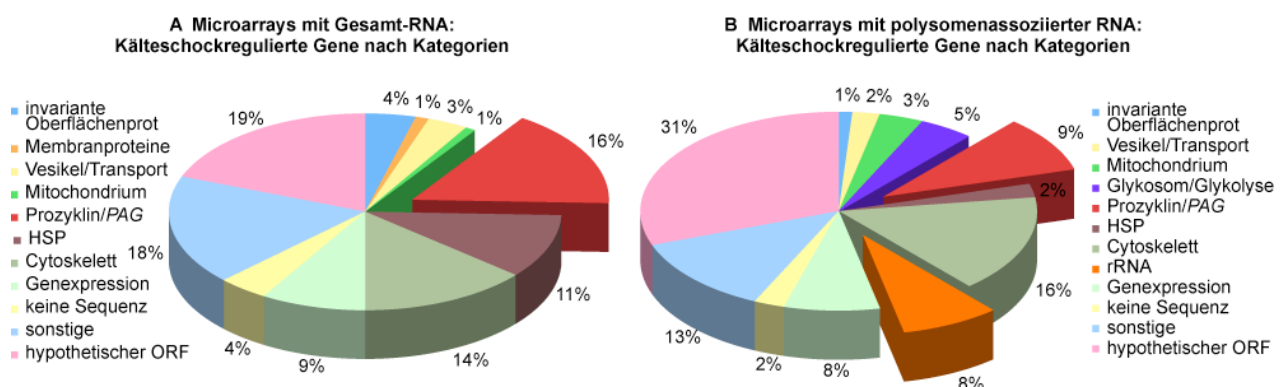


ähnliche Ergebnisse. Aktuellere Arbeiten können aufgrund der durch die Weiterentwicklung der Methode gestiegenen Sensitivität mittlerweile mehr regulierte Transkripte identifizieren und gehen davon aus, dass im Verlauf der Differenzierung von *T. brucei* >10% der Gene differenziell reguliert sind (Kabani et al. 2009; Queiroz et al. 2009). Für *Saccharomyces cerevisiae* wurde gezeigt, dass sich die Expression von etwa 25% aller Gene nach Kälteschock ändert (Sahara et al. 2002). Die Anzahl der regulierten Gene bei *Trypanosomatiden* ist vergleichsweise gering. Das könnte daran liegen, dass die Expression überwiegend posttranskriptionell reguliert wird. Effekte wie die Kontrolle der Translation, Proteinprozessierung, –Lokalisierung oder –Degradierung, die einen erheblichen Anteil der Genregulation ausmachen können, werden durch die Microarraymethode nicht erfasst.

Die statistische Auswertung der Microarray-Experimente wurde von Stefanie Brems am DKFZ in Heidelberg durchgeführt und ist in ihrer Dissertation (Brems 2006) detailliert beschrieben. Jeder Zeitpunkt (4; 8; 16 h) wurde kompetitiv mit der uninduzierten Kontrolle (37 °C) co-hybridisiert. Es wurden fünf Wiederholungen jeder Kondition durchgeführt. Die Korrespondenzanalyse mit dem Programm M-CHiPS bestätigte die Reproduzierbarkeit der Hybridisierungsreplikate.

### 3.3.1.1 Genexpression nach Kälteschock

Zunächst wurde eine Einteilung der regulierten Gene in verschiedene Kategorien vorgenommen. In Abb. 32 (A) sind die in der Microarrayanalyse am stärksten ( $\geq 2,5$ -fach) differenziell regulierten Gene zusammengefasst dargestellt. Etwa 16% der Sequenzen fallen in die Kategorie Prozyklin/PAG. Diese umfasst die verschiedenen Prozykline, die als Positivkontrollen dienen, sowie die *PAG*-, und *GRESAG*-Gene. Für die meisten Gene dieser Klasse konnte bereits nach vierstündigem Kälteschock eine Steigerung der Expression gezeigt werden. Die stärksten Induktionen (bis zu sechsfach) des Microarray-Experiments mit Gesamt-RNA wurden bei den verschiedenen Prozyklingen festgestellt. Dieses entspricht den Erwartungen und bestätigt die bisherigen Untersuchungen zur Prozyklinexpression nach Kälteschock durch Northern Blot bzw. quantitative Real Time PCR.

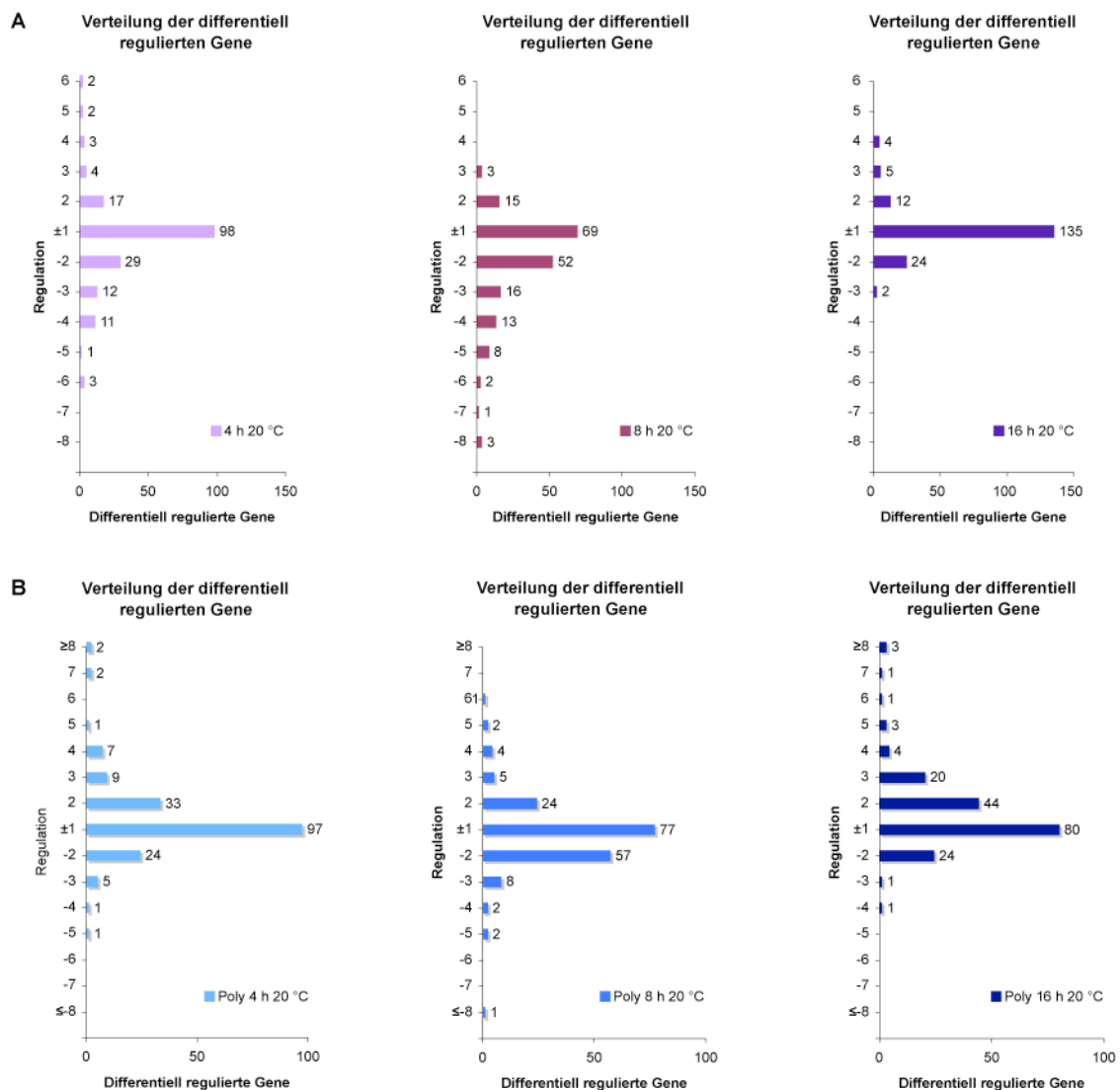


**Abb. 32: Teilmenge aller durch Kälteschock  $\geq 2,5$ -fach regulierten Sequenzen nach Einteilung in funktionelle Kategorien**

Die Gruppen Prozyklin/PAG sowie rRNA sind hervorgehoben. (A) Ergebnisse der Microarrays mit Gesamt-RNA. Details zu den 94 dargestellten Sequenzen sind in Tab. 4 aufgelistet. (B) Ergebnisse der Microarrays mit polysomenassoziierter RNA. Details zu den 88 dargestellten Sequenzen sind in Tab. 5 aufgelistet.

Die Korrespondenzanalyse der gefilterten Daten zeigt eine Gruppierung der untersuchten Konditionen (4; 8 bzw. 16 h 20 °C) in voneinander getrennte Cluster. Diese spricht deutlich dafür, dass sich die mRNA-Menge als Reaktion auf einen Kälteschock über die Zeit verändert. Die Anzahl der Zeitpunkte ist jedoch nicht ausreichend, um Aussagen über die Zeitliche Abfolge von Expressionsänderungen zu erlauben.

In Abb. 33 (A) ist die Regulation von 182 in mindestens einer Kondition stark regulierten Genen zusammengefasst. Eine tabellarische Aufstellung befindet sich im elektronischen Anhang (siehe 6.7). Nach vierstündiger Induktion werden bis zu sechsfache Expressionsunterschiede detektiert. Nach 8 h sind die meisten  $\geq 2$ -fach differenziell regulierten Gene detektierbar. Hier sind vor allem Gene überrepräsentiert, die den Kategorien „Cytoskelett“ oder „Mitochondrium“ zugeordnet werden können. Die Induktionsfaktoren der Gene sind geringer (maximal dreifach) als nach 4 h. Stattdessen sind hier die meisten durch Kälteschock reprimierten Gene (zwei- bis achtfach) festzustellen. Nach längerer Induktion (16 h) verringert sich die Zahl der differenziell regulierten Gene wieder.



**Abb. 33: Änderungen der Genexpression nach Kälteschockinduktion für 4; 8 oder 16 h**

Auswertung der Microarrayanalyse mit Gesamt-RNA (A) bzw. polysomenassoziiierter RNA (B). Die gerundeten Faktoren der am stärksten regulierten Sequenzen sind angegeben (Regulationen von -1,49 bis +1,49 sind jeweils in der Kategorie  $\pm 1$  zusammengefasst). Induktion ist durch positive, Repression durch negative Werte dargestellt.

Gesamt- RNA Microarrays: Durch Kälteschock induzierte Gene	4 h 20 °C		Kategorie	Gen	#
	6,29	Prozyklin/PAG		EP3-2 procyclin	*
	6,22	keine Sequenz			
	5,44	Prozyklin/PAG		Tb06.28F21.70, EP3-2 procyclin	* 3
	4,65	Prozyklin/PAG		GPEET and EP3	*
	4,45	Transporter		Tb10.6k15.1350, pteridine transporter, putative	3
	3,91	Prozyklin/PAG		Tb06.28F21.180, GRESAG2	* 2
	3,87	Genexpression		Tb10.70.4600, 3'-UTR elongation factor, putative	
	3,13	RHS/INGI		INGI	
	2,68	sonstige		Tb10.389.1480, metalloprotease, putative	
Gesamt- RNA Microarrays: Durch Kälteschock reprimierte Gene	8 h 20 °C		Kategorie	Gen	#
	3,18	Membranprotein		Tb10.61.2640, aquaporin 9, putative	
	2,66	keine mRNA		Tb927_2_v3 [~/tryp/curated/chr2/Tb927_2_v3.emb]	
	2,54	sonstige		Tb09.160.1790, conserved hypothetical	
	16 h 20 °C		Kategorie	Gen	#
	4,25	Prozyklin/PAG		Tb10.6k15.0040, PAG1	* 2
	3,66	Prozyklin/PAG		EP3-2 procyclin	*
	3,62	Prozyklin/PAG		Tb06.28F21.70, EP3-2 procyclin	* 3
	3,50	Prozyklin/PAG		GPEET and EP3	*
	3,42	keine Sequenz			
	3,24	Prozyklin/PAG		Tb06.28F21.180, GRESAG2	* 2
Gesamt- RNA Microarrays: Durch Kälteschock induzierte Gene	3,23	Prozyklin/PAG		GRESAG 2.1	*
	2,63	Prozyklin/PAG		PAG1	*
	2,52	Transporter		Tb10.6k15.1350, pteridine transporter, putative	3
	4 h 20 °C		Kategorie	Gen	#
	-2,50	sonstige		Tb09.160.1160, hypothetical protein, conserved	3
	-2,58	sonstige		Tb10.70.5250, metacaspase MCA4	
	-2,59	Vesikel/Transport		Tb05.1P6.700, lysosomal/endosomal membrane protein p67	2
	-2,67	Cytoskelett		Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	7
	-2,73	Cytoskelett		Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	7
	-2,87	HSP		Tb07.26A24.660, chaperone protein DNAJ, putative	
	-2,95	Cytoskelett		Tb11.01.3805, CAP15	2
Gesamt- RNA Microarrays: Durch Kälteschock reprimierte Gene	-2,95	sonstige		Tb09.160.1160, hypothetical protein, conserved	3
	-2,98	Cytoskelett		Tb08.28L1.260, dynein heavy chain, putative	3
	-3,21	Genexpression		Tb10.70.2650, elongation factor 2	4
	-3,26	Cytoskelett		Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	7
	-3,33	sonstige		Tb11.02.0730, metacaspase	
	-3,50	Genexpression		Tb10.70.2650, elongation factor 2	4
	-3,51	sonstige		Tb07.2F2.320, hypothetical protein, conserved	2
	-3,55	sonstige		Tb10.05.0040, hypothetical protein, conserved	2
	-3,64	sonstige		Tb10.70.5020, hypothetical protein, conserved	2
	-3,70	HSP		Tb10.26.1080, heat shock protein 83	8
Gesamt- RNA Microarrays: Durch Kälteschock induzierte Gene	-3,80	HSP		Tb10.26.1080, heat shock protein 83	8
	-3,88	LRR		Tb11.02.0910, hypothetical protein, conserved LRRP	2
	-4,06	HSP		Tb10.26.1080, heat shock protein 83	8
	-4,07	HSP		Tb10.26.1080, heat shock protein 83	8
	-4,32	ISG		Tb05.29K2.340, 75 kDa invariant surface glycoprotein, putative	4
	-4,33	HSP		Tb10.26.1080, heat shock protein 83	8
	-4,53	sonstige		Tb04.29M18.750, repetitive 500kD protein, putative	3
	-5,50	ISG		Tb05.29K2.330, 75 kDa invariant surface glycoprotein, putative	4
	-5,56	sonstige		Tb08.5H5.930, hypothetical protein, conserved	2
	-5,60	HSP		Tb11.02.5500, glucose-regulated protein 78, putative (BiP-like)	
Gesamt- RNA Microarrays: Durch Kälteschock reprimierte Gene	8 h 20 °C		Kategorie	Gen	#
	-2,50	HSP		Tb10.26.1080, heat shock protein 83	8
	-2,52	Genexpression		Tb11.03.0140, nucleoporin, putative	
	-2,53	sonstige		Tb10.70.4280, delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative	
	-2,55	sonstige		Tb11.01.3290, hypothetical protein, conserved	
	-2,59	Vesikel/Transport		Tb05.1P6.700, lysosomal/endosomal membrane protein p67	2
	-2,62	ESAG		ESAG4-like	
	-2,64	Cytoskelett		Tb08.28L1.260, dynein heavy chain, putative	3
	-2,78	Cytoskelett		Tb11.01.3805, CAP15	2
	-2,78	sonstige		Tb09.160.1160, hypothetical protein, conserved share GB4 3'UTR	3
Gesamt- RNA Microarrays: Durch Kälteschock induzierte Gene	-2,93	sonstige		Tb07.22O10.90, hypothetical protein, conserved	
	-2,95	Genexpression		Tb10.70.4720, importin beta-1 subunit, putative	
	-3,04	sonstige		Tb08.5H5.930, hypothetical protein, conserved	2
	-3,07	Cytoskelett		Tb08.28L1.260, dynein heavy chain, putative	3
	-3,13	Cytoskelett		Tb07.6C8.180, kinesin K39, putative	
	-3,22	sonstige		Tb07.2F2.320, hypothetical protein, conserved	2
	-3,36	sonstige		Tb08.29O9.380, major surface protease gp63, putative	
	-3,53	Genexpression		Tb09.211.1070, hypothetical protein, conserved	
	-3,63	Prozyklin/PAG		GPEET and EP3	*
	-3,63	keine mRNA		Tb08.26A17.430, Tb08.26A17.430	
Gesamt- RNA Microarrays: Durch Kälteschock reprimierte Gene	-3,65	sonstige		Tb11.01.8650, hypothetical protein, conserved	
	-3,73	Cytoskelett		Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	7
	-3,80	RHS/INGI		H25N7.04, INGI protein (ORF1)	
	-3,93	Mitochondrium		Tb11.47.0004, 2-oxoglutarate dehydrogenase subunit, putative	
	-3,93	sonstige		Tb04.29M18.750, repetitive 500kD protein, putative	3
	-4,01	sonstige		Tb10.05.0040, hypothetical protein, conserved	2
	-4,07	sonstige		Tb11.02.5190, pantothenate kinase subunit, putative	
	-4,10	keine Sequenz			
	-4,38	Prozyklin/PAG		Tb06.28F21.70, EP3-2 procyclin	* 3
	-4,49	sonstige		Tb11.02.0910, hypothetical protein, conserved LRRP	2
Gesamt- RNA Microarrays: Durch Kälteschock induzierte Gene	-4,51	sonstige		Tb04.29M18.750, repetitive 500kD protein, putative	3
	-4,57	ISG		Tb05.29K2.330, 75 kDa invariant surface glycoprotein, putative	4
	-4,59	ISG		Tb05.29K2.340, 75 kDa invariant surface glycoprotein, putative	4
	-4,60	sonstige		Tb10.70.5020, hypothetical protein, conserved	2
	-4,60	keine Sequenz			
	-4,69	Prozyklin/PAG		EP3-2 procyclin	*
	-4,79	Transporter		Tb10.6k15.1350, pteridine transporter, putative	3
	-4,86	Transporter		Tb08.12O16.210, cation-transporting ATPase, putative	
	-5,65	Cytoskelett		Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	7
	-6,48	Cytoskelett		Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	7
Gesamt- RNA Microarrays: Durch Kälteschock reprimierte Gene	-7,04	Genexpression		Tb10.70.2650, elongation factor 2	4
	-8,07	Cytoskelett		Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	7
	-8,07	Genexpression		Tb10.70.2650, elongation factor 2	4
	-8,09	Cytoskelett		Tb11.02.0760, dynein heavy chain, putative	
	16 h 20 °C		Kategorie	Gen	#
	-2,55	HSP		Tb10.26.1080, heat shock protein 83	8
	-2,60	HSP		Tb10.26.1080, heat shock protein 83	8

Tab. 4: Nach Kälteschock  $\geq 2,5$ -fach regulierte Gene aus Abb. 32 (A)

Die Anzahl der Mehrfachdetektionen innerhalb dieses Experiments ist rechts (#) angegeben. Gene der Kategorie Prozyklin/PAG sind hervorgehoben (\*). Induktion ist durch positive, Repression durch negative Werte dargestellt.

Microarrays mit polysomaler RNA: Durch Kälteschock induzierte Gene	4 h 20 °C	Kategorie	Gen	#
	8,36	Vesikel/Transport	Tb10.70.1190, VCP valosin-containing protein homolog	2
	7,88	Genexpression	Tb10.70.2650, elongation factor 2	3
	7,10	sonstige	Tb07.22O10.90, hypothetical protein, conserved	3
	6,85	Genexpression	Tb11.03.0140, nucleoporin, putative	
	5,00	rRNA	tmp.1.100, rRNA cluster	5
	3,99	rRNA	tmp.1.100, rRNA cluster	5
	3,95	Cytoskelett	Tb08.28L1.260, dynein heavy chain, putative	2
	3,90	rRNA	tmp.1.100, rRNA cluster	5
	3,85	hypothetischer ORF	Tb927.1.3740, hypothetical protein, unlikely	2
	8 h 20 °C	Kategorie	Gen	#
	6,48	Prozyklin/PAG	Tb06.28F21.70, EP3-2 procyclin	* 3
	5,04	Prozyklin/PAG	Tb06.28F21.180, GRESAG2	* 2
	4,78	Prozyklin/PAG	EP3-2 procyclin	*
	4,49	Transporter	Tb10.6k15.1350, pteridine transporter, putative	
	3,87	sonstige	Tb07.22O10.90, hypothetical protein, conserved	3
	3,71	sonstige	Tb07.2F2.320, hypothetical protein, conserved	2
	3,62	keine Sequenz		
	3,59	Prozyklin/PAG	GPEET and EP3	*
	3,32	sonstige	Tb10.05.0040, hypothetical protein, conserved	2
	16 h 20 °C	Kategorie	Gen	#
	13,06	Cytoskelett	Tb11.02.0760, dynein heavy chain, putative	2
	11,29	Cytoskelett	Tb08.28L1.260, dynein heavy chain, putative	2
	7,87	hypothetischer ORF	Tb04.29M18.750, repetitive 500kD protein, putative	3
	6,74	Genexpression	Tb10.70.2650, elongation factor 2	3
	5,65	hypothetischer ORF	Tb04.29M18.750, repetitive 500kD protein, putative	3
	5,13	sonstige	Tb07.22O10.90, hypothetical protein, conserved	3
	4,70	Prozyklin/PAG	Tb06.28F21.70, EP3-2 procyclin	* 3
	4,65	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	5
	4,37	sonstige	Tb10.70.6920, hypothetical protein, conserved	
Microarrays mit polysomaler RNA: Durch Kälteschock reprimierte Gene	4 h 20 °C	Kategorie	Gen	#
	-2,56	Cytoskelett	Tb07.6C8.180, kinesin K39, putative	2
	-2,59	hypothetischer ORF	Tb04.29M18.750, repetitive 500kD protein, putative	3
	-2,66	sonstige	Tb08.10J17.430, hypothetical protein, conserved	
	-3,03	sonstige	Tb10.389.1480, metalloprotease, putative	3
	-3,20	sonstige	Tb10.70.1360, hypothetical protein, conserved	2
	-4,17	Transporter	Tb08.12O16.210, cation-transporting ATPase, putative	
	-5,00	Mitochondrium	Tb03.26J7.860, fumarate hydratase	2
	8 h 20 °C	Kategorie	Gen	#
	-2,50	Glykosom/Glykoneogenese	Tb03.3K10.320, TbPFK, ATP-dependent phosphofructokinase	
	-2,57	Cytoskelett	Tb11.02.0760, dynein heavy chain, putative	2
	-2,58	Vesikel/Transport	Tb11.02.5500, glucose-regulated protein 78, putative (BiP-like)	
	-2,69	Glykosom/Glykoneogenese	Tb10.70.1370, fructose-1,6-bisphosphate Aldolase	2
	-2,79	sonstige	Tb10.70.1140, hypothetical protein, conserved	
	-2,80	sonstige	Tb10.70.4280, delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative	
	-3,07	Glykosom/Glykoneogenese	Tb10.70.1370, fructose-1,6-bisphosphate Aldolase	2
	-3,31	sonstige	Tb927.1.3840, hypothetical protein, conserved	
	-3,53	Glykosom/Glykoneogenese	Tb10.70.5800, HK hexokinase	
	-3,70	sonstige	Tb10.389.1480, metalloprotease, putative	3
	-4,54	Mitochondrium	Tb03.26J7.860, fumarate hydratase	2
	-4,86	sonstige	Tb10.70.1360, hypothetical protein, conserved	2
	-8,76	Genexpression	Tb09.211.3610, UBA2 ubiquitin-activating enzyme E1, putative	
	16 h 20 °C	Kategorie	Gen	#
	-2,70	sonstige	Tb10.389.1480, metalloprotease, putative	3
	-3,70	LRR	Tb11.02.0910, hypothetical protein, conserved LRRP	2

Tab. 5: Nach Kälteschock  $\geq 2,5$ -fach regulierte Gene aus Abb. 32 (B)

Die Anzahl der Mehrfachdetektionen innerhalb dieses Experiments ist rechts (#) angegeben. Gene der Kategorie Prozyklin/PAG sind hervorgehoben (\*). Induktion ist durch positive, Repression durch negative Werte dargestellt.

### 3.3.1.2 Microarrays mit polysomenassoziiierter RNA

Die Genexpression bei Kinetoplastiden ist vor allem posttranskriptionell reguliert. mRNA-Stabilität sowie die Initiation der Translation sind die wichtigsten Ebenen der Genregulation. Zusätzlich zu den Unterschieden der RNA-Abundanz, die in Microarrays mit Gesamt-RNA detektiert werden, sollen durch die Verwendung von polysomenassoziiierter RNA in einem weiteren Microarray-Experiment auch Einflüsse des Kälteschocks auf die Initiation der Translation untersucht werden. In Abb. 32 (B) sind die am stärksten ( $\geq 2,5$ -fach) regulierten Gene dieser Analyse zusammengefasst dargestellt. Der Anteil von regulierten Sequenzen aus der Kategorie Prozyklin/PAG ist mit 9% geringer als bei dem Experiment mit Gesamt-RNA (16%). 8% der differenziell regulierten Transkripte können der Kategorie der rRNA Gene zugeordnet werden. Da die Anreicherung der an die Ribosomen gebundenen RNAs für alle Konditionen auf identische Weise erfolgte, ist diese Beobachtung möglicherweise darauf zurückzuführen, dass sich die generelle Abundanz ribosomaler RNA durch Kälteschock ändert. Im Vergleich zu dem Experiment mit Gesamt-RNA ist ein deutlicher Anstieg der Effekte zu beobachten. Nach Kälteschock werden bis zu 13-fache Veränderungen der Genregulation festgestellt [siehe Abb. 33 (B)].

### 3.3.1.3 Kälteschock- und stadienspezifische Regulation

Die Prozyklingene dienen als Marker für die Differenzierung zum prozyklischen Stadium der Trypanosomen. Die Microarrayanalyse wies für mehrere Vertreter dieser Multigenfamilie einen deutlichen Anstieg der Genexpression durch Kälteschock nach. Neben den *EP* und *GPEET* Prozyklinen, wurde auch bei den cotranskribierten *PAG1* und *GRESAG2* Genen eine Induktion festgestellt (siehe. Tab. 4 und Tab. 5). Weitere bekannte Marker für PCF konnten unter den deutlich kälteschockregulierten Sequenzen nicht gefunden werden. Die Expression des *CAP5.5* Gens (Matthews und Gull 1994) ändert sich nur leicht (aber signifikant). Die Schnittmenge der Ergebnisse aus den Microarrays nach Kälteschock und denen, die zum Vergleich der Genexpression von BSF und PCF angefertigt wurden (Diehl et al. 2002), besteht aus nur 19 Genen (siehe Tab. 6). Acht davon sind in den BSF Kontrollen verstärkt exprimiert, die restlichen elf sind sowohl nach Kälteschock als auch bei PCF induziert. Für einige dieser Gene wurde in der Zwischenzeit die Proteinexpression im entsprechenden Stadium nachgewiesen (siehe Tab. 6). Die stadienspezifische mRNA-Expression von drei der angegebenen Gene wurde mittlerweile in einem unabhängigen, subgenomischen Microarray verifiziert (Koumandou et al. 2008).

Von Engstler und Boshart (2004) wurde beschrieben, dass durch Kälteschock nicht nur die Prozyklinexpression ansteigt, sondern auch die Sensitivität gegenüber dem *in vitro* Differenzierungssignal Citrat (oder *cis*-Aconitat). Die Erhöhung der intrazellulären Citratmenge durch Überexpression einer transgenen Citrat-Synthase, hat jedoch keinen Einfluss auf die Differenzierung (Fast 2000). Aus diesen Beobachtungen wurde eine Arbeitshypothese entwickelt, die einen an der Plasmamembran lokalisierten Citratrezeptor postuliert, der nach Erkennung von extrazellulärem

Citrat die Differenzierung von BSF zu PCF einleitet. Invariante Membranproteine können in BSF jedoch als potentielles Angriffsziel für das Immunsystem des Wirts dienen. Zur Erklärung der Hypersensitivität gegenüber Citrat und *cis*-Aconitat wurde deshalb die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die Expression und Lokalisation des vermuteten Citratrezeptors in gleicher Weise wie EP reguliert wird (siehe Abb. 7). Durch Datenbanksuche mit den Proteinsequenzen der durch Kälteschock induzierten Kandidatengene konnten jedoch keine Ähnlichkeiten zu vergleichbaren Rezeptoren gefunden werden.

Accession Nr. (alt/aktuell)		Kategorie	Genname	Regulation	Referenzen zur Expression	Referenzen zur Regulation
Tb10.61.1750	Tb927.10.14890	Cytoskelett	TBKIFC1 C-terminales Motor Kinesin, putativ	-	Expression in BSF (Vertommen et al. 2008) und PCF (Jones et al. 2006)	
Tb11.01.3805		Cytoskelett	CAP15, Mikrotubuli-assoziiertes Protein; Korsett-assoziiertes Protein 15	-	Expression in BSF (Vertommen et al. 2008)	induziert in BSF (Koumandou et al. 2008)
Tb05.25N21.370	Tb927.5.120	Expression site	ESAG9-ähnlich	-		
Tb03.3K10.320	Tb927.3.3270	Glykosom/ Glykolyse	TbPFK, ATP-abhängige 6-phospho-1-fructokinase	-	Expression in BSF (Vertommen et al. 2008) und PCF (Jones et al. 2006)	
Tb10.70.1370	Tb927.10.5620	Glykosom/ Glykolyse	ALD, Fruktose-bisphosphat Aldolase, glykosomal	-	Expression in BSF (Vertommen et al. 2008) und PCF (Jones et al. 2006)	
Tb10.70.5800	Tb927.10.2020	Glykosom/ Glykolyse	HK2, Hexokinase	-	Expression in BSF (Vertommen et al. 2008) und PCF (Jones et al. 2006)	induziert in BSF (Koumandou et al. 2008)
Tb05.29K2.340	Tb927.5.400	invariantes Oberflächenprotein	75 kDa invariantes Oberflächen-Glykoprotein, putativ	-		
Tb03.26J7.160	Tb927.3.4110	Membranprotein	Hypothetisch, konserviert, 14 Transmembran Domänen	-		
Tb10.70.4600	Tb927.10.2960	Genexpression	3'-UTR elongations Faktor, putativ	+		
Tb03.26J7.860	Tb927.3.4500	Mitochondrium	Fumarat Hydratase, putativ	+	Expression in PCF (Jones et al. 2006, Vertommen et al. 2008)	
Tb06.28F21.70	Tb927.6.520	Prozyklin/PAG	EP3-2 Prozyklin	+	Expression PCF spezifisch	
Tb06.28F21.90	Tb927.6.510	Prozyklin/PAG	GPEET	+	Expression PCF spezifisch	
Tb06.28F21.120	Tb927.6.500	Prozyklin/PAG	GRESAG2	+		
Tb10.389.1480	Tb927.10.12260	sonstige	Metalloprotease, putativ	+	Expression in PCF (Jones et al. 2006, Vertommen et al. 2008)	
Tb10.6k15.3510	Tb927.10.7180	sonstige	CRAM, Cysteine-reiches, saures integrales Membranprotein, Vorläufer	+		induziert in PCF (Koumandou et al. 2008)
Tb04.3I12.190	Tb927.4.4730	Transporter	AATP11, Aminosäure Transporter, putativ 11 Transmembran Domänen	+		
Tb07.10C21.20	Tb927.7.5930	Transporter	Hypothetisch, konserviert, 13 Transmembran Domänen	+		
Tb07.2F2.140	Tb927.7.5990	Transporter	Transporter-ähnlich, Genwiederholungen, 13 Transmembran Domänen	+		
Tb10.6k15.1350	Tb927.10.9080	Transporter	Pteridine transporter, putativ	+		

Tab. 6: Schnittmenge der sowohl kälteschockabhängig als auch stadienspezifisch (Diehl et al. 2002) regulierten Gene

In BSF (37 °C) verstärkt exprimierte Gene sind mit – gekennzeichnet, nach Kälteschock bzw. in PCF induzierte Gene sind mit + markiert. Hinweise zur Genexpression bzw. -Regulation aus der Literatur sind angegeben.

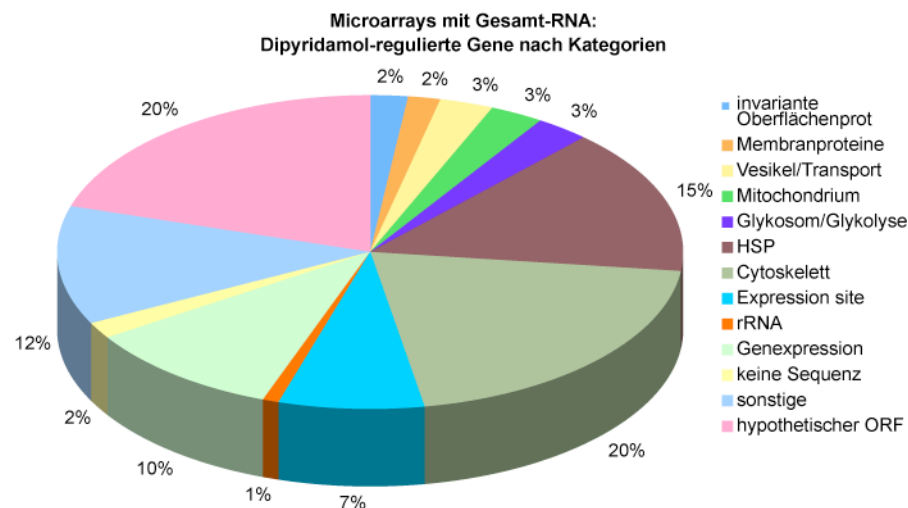
### 3.3.2 Microarrayanalyse nach Inkubation mit Dipyridamol

Das bei vielen Organismen als Signalmolekül verbreitete cAMP oder dessen Hydrolyseprodukte (Laxman und Beavo 2007) unterstützen in Trypanosomen die Umwandlung von slender zu stumpy BSF (Vassella et al. 1997) und werden auch mit der Differenzierung zu PCF in Zusammenhang gebracht (Rolin et al. 1993). Dipyridamol inhibiert alle bisher in *T. brucei* bekannten PDEs (Zoraghi et al. 2001; Rascon et al. 2002; Zoraghi und Seebeck 2002; Kunz et al. 2004) und führt so zum intrazellulären Anstieg der cAMP-Menge. Um differenziell regulierte Gene zu identifizieren, wurden die Veränderungen im Transkriptom logarithmisch wachsender MITat 1.2 BSF nach Induktion (2-8 h) mit dem PDE-Inhibitor Dipyridamol (20 µM) bzw. der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) durch Microarrayhybridisierung analysiert.

Die statistische Auswertung der Microarray-Experimente wurde von Stefanie Brems am DKFZ in Heidelberg durchgeführt und ist in ihrer Dissertation (Brems 2006) detailliert beschrieben. Jeder Zeitpunkt (2; 4; 8h) wurde kompetitiv mit der Lösungsmittelkontrolle (8 h mit DMSO inkubiert) co-hybridisiert. Es wurden fünf Wiederholungen jeder Kondition durchgeführt. Die Korrespondenzanalyse (CA) mit dem Programm M-CHiPS bestätigte die Reproduzierbarkeit der Hybridisierungsreplikate.

### 3.3.2.1 Genexpression nach Zugabe von Dipyridamol

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auch hier zunächst eine Einteilung der regulierten Gene in verschiedene Kategorien vorgenommen. In (siehe Abb. 34) sind die am stärksten ( $\geq 2,5$ -fach) differenziell regulierten Gene der Microarrayanalyse zusammengefasst dargestellt. Auffallend hoch (auch im Vergleich zu dem Effekt des Kälteschocks) ist der Anteil von Stressproteinen. 15% der am stärksten differenziell regulierten Transkripte können dieser Kategorie (HSP) zugeordnet werden.



**Abb. 34: Teilmenge aller nach Dipyridamolzugabe  $\geq 2,5$ -fach regulierten Sequenzen nach Einteilung in funktionelle Kategorien**

Details zu den 108 dargestellten Sequenzen sind in Tab. 7 aufgelistet.

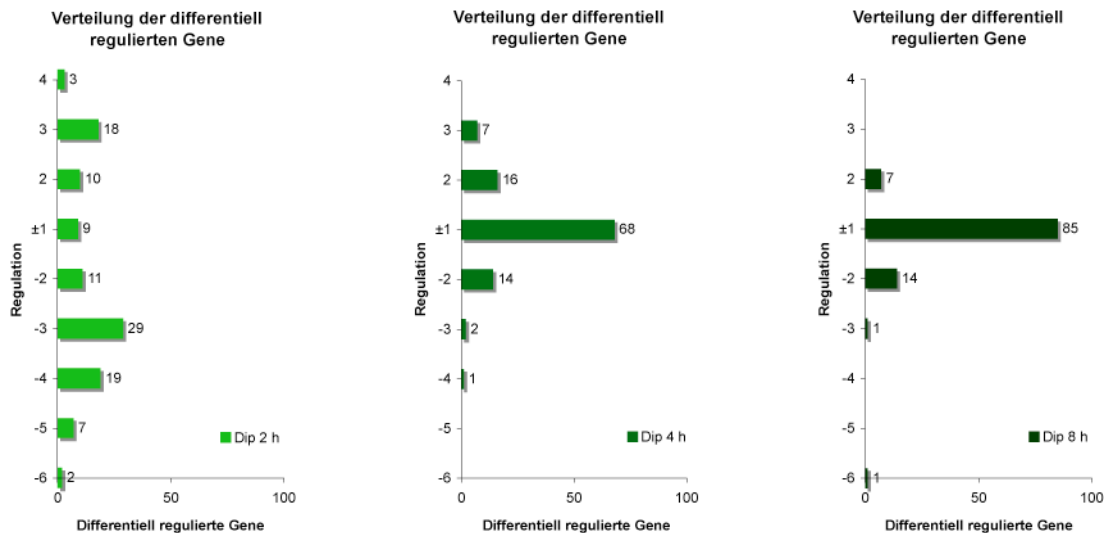
Die im CA-Plot beobachtete Gruppierung der Datensätze verschiedener Konditionen in drei deutlich zu unterscheidende Cluster zeigt, dass die mRNA-Expression als Reaktion auf die Behandlung mit Dipyridamol zeitlich reguliert ist. Bereits die relative Position des Clusters der den Datensatz nach zweistündiger Induktion im CA-Plot repräsentiert, deutet darauf hin, dass die Gene dieser Kondition am stärksten reguliert sind (Brems 2006). Die in Abb. 35 dargestellte Verteilung verdeutlicht diese Beobachtung. Die Mehrheit aller regulierten Gene zeigt in dieser Kondition die größte Änderung der Expression. Nach längerer Inkubation mit Dipyridamol (4 bzw. 8 h) sinkt die Anzahl der stärker als zweifach regulierten Gene drastisch. Nach 8 h sind nur noch zwei Gene  $\geq 2,5$ -fach reguliert.

Gesamt-RNA: Durch Dipyridamol induzierte Gene	2 h Dipy.	Kategorie	Gen	#
	3,85	Transporter	Tb06.26G9.340, cationic amino acid transporter, putative	
	3,65	sonstige	Tb11.52.0003, OPB oligopeptidase b	2
	3,61	sonstige	Tb11.01.8510, TCP-1-alpha t-complex protein 1, alpha subunit, putative	
	3,18	sonstige	Tb11.01.1530, hypothetical protein, conserved	
	3,15	hypothetischer ORF	Tb07.15M23.430, hypothetical	
	3,07	sonstige	Tb06.26G9.1150, hypothetical protein, conserved	2
	3,07	sonstige	Tb06.26G9.1150, hypothetical protein, conserved	2
	3,06	Mitochondrium	Tb11.02.1120, adenylosuccinate synthetase, putative	
	2,99	keine Sequenz		
	2,93	sonstige	Tb11.02.4450, hypothetical protein, conserved	
	2,76	hypothetischer ORF	Tb10.1820, hypothetical protein	
	2,73	Mitochondrium	Tb07.33N13.230, NADH-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial, putative	
	2,68	Membranprotein	Tb10.6k15.1690, hypothetical conserved 7 TM domains N-term DNAJ dom	2
	2,68	sonstige	Tb11.52.0003, OPB oligopeptidase b	2
	2,67	Membranprotein	Tb10.6k15.1690, hypothetical conserved 7 TM domains N-term DNAJ dom	2
	2,67	sonstige	Tb08.28F14.550, cytosolic leucyl aminopeptidase, putative	2
	2,66	sonstige	Tb07.27E10.660, hypothetical protein, conserved	
	2,63	Genexpression	Tb927.2.4710, 30M24.225 RNA-binding protein, putative	
	2,6	sonstige	Tb10.26.0310, hypothetical protein, conserved	
	2,59	sonstige	Tb08.28F14.550, cytosolic leucyl aminopeptidase, putative	2
	2,58	Glykosom/Glykoneogenese	Tb03.3K10.320, TbPFK ATP-dependent phosphofructokinase	3
Gesamt-RNA: Durch Dipyridamol reprimierte Gene	4 h Dipy.	Kategorie	Gen	#
	3,08	Glykosom/Glykoneogenese	Tb03.3K10.320, TbPFK ATP-dependent phosphofructokinase	3
	2,91	Glykosom/Glykoneogenese	Tb03.3K10.320, TbPFK ATP-dependent phosphofructokinase	3
	3	Cytoskelett	Tb03.27F10.490, dynein heavy chain, putative	
	2,92	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
	3,28	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
	2,71	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
	2,68	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
Gesamt-RNA: Durch Dipyridamol reprimierte Gene	2 h Dipy.	Kategorie	Gen	#
	-5,74	Genexpression	Tb03.48K5.830, 60S ribosomal protein L4	
	-5,59	Cytoskelett	Tb03.26J7.510, PFR1 PFRC 73 kDa paraflagellar rod protein	5
	-5,44	Cytoskelett	Tb08.5H5.900, PFR2 PFRA 69 kDa paraflagellar rod protein	2
	-5,15	Cytoskelett	Tb03.26J7.510, PFR1 PFRC 73 kDa paraflagellar rod protein	5
	-4,89	Cytoskelett	Tb03.26J7.510, PFR1 PFRC 73 kDa paraflagellar rod protein	5
	-4,86	Cytoskelett	Tb03.26J7.510, PFR1 PFRC 73 kDa paraflagellar rod protein	5
	-4,64	Cytoskelett	Tb08.5H5.900, PFR2 PFRA 69 kDa paraflagellar rod protein	2
	-4,58	Cytoskelett	Tb03.26J7.510, PFR1 PFRC 73 kDa paraflagellar rod protein	5
	-4,54	Genexpression	Tb10.70.2650, elongation factor 2	4
	-4,46	Genexpression	Tb10.70.2650, elongation factor 2	4
	-4,41	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
	-4,35	sonstige	Tb927.1.3450, hypothetical, conserved, Seq =5018, 58 D11	
	-4,22	sonstige	Tb07.27M11.320, hypothetical protein, conserved	
	-4,2	HSP	Tb10.26.1080, heat shock protein 83	13
	-4,17	Genexpression	Tb08.29O9.340, lysyl-tRNA synthetase, putative	2
	-4,17	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
	-4,06	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
	-3,98	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
	-3,91	HSP	Tb10.70.0430, chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	2
	-3,88	HSP	Tb10.26.1080, heat shock protein 83	13
	-3,81	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
	-3,79	ISG	Tb05.29K2.330, 75 kDa invariant surface glycoprotein, putative	2
	-3,75	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
	-3,7	HSP	Tb10.26.1080, heat shock protein 83	13
	-3,66	HSP	Tb10.26.1080, heat shock protein 83	13
	-3,61	Genexpression	Tb10.70.2650, elongation factor 2	4
	-3,57	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
	-3,5	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
	-3,49	Cytoskelett	Tb10.1450, microtubule-associated protein 2	
	-3,4	HSP	Tb10.26.1080, heat shock protein 83	13
	-3,4	HSP	Tb10.26.1080, heat shock protein 83	13
	-3,39	sonstige	Tb10.70.0520, MVP major vault protein, putative	
	-3,39	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
	-3,37	HSP	Tb10.26.1080, heat shock protein 83	13
	-3,36	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
	-3,35	HSP	Tb10.26.1080, heat shock protein 83	13
	-3,29	sonstige	Tb07.2F2.320, hypothetical protein, conserved	
	-3,29	Cytoskelett	Tb09.160.1200, mitotubule-associated protein GB4, putative	15
	-3,26	HSP	Tb10.26.1080, heat shock protein 83	13
	-3,25	sonstige	Tb10.70.5020, hypothetical protein, conserved	3
	-3,18	HSP	Tb10.26.1080, HSP83 complement (2559436..2561550)	13
	-3,15	Vesikel/Transport	Tb11.02.5500, glucose-regulated protein 78, putative (BiP-like)	3
	-3,14	Genexpression	Tb10.70.2650, elongation factor 2	4
	-3,09	HSP	Tb10.70.0430, chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	2
	-3,06	Cytoskelett	Tb08.28L1.260, dynein heavy chain, putative	
	-3,03	Genexpression	Tb11.01.1680, polyubiquitin, putative	
	-3,03	Vesikel/Transport	Tb11.02.5500, glucose-regulated protein 78, putative (BiP-like)	3
	-2,89	sonstige	Tb11.01.0510, hypothetical protein, conserved	
	-2,88	Vesikel/Transport	Tb04.5E12.910, gamma-adaptin 1, putative	
	-2,86	Cytoskelett	Tb11.01.0390, dynein heavy chain, putative	
	-2,83	sonstige	Tb11.01.8770, hypothetical protein, conserved	
	-2,83	ISG	Tb05.29K2.340, 75 kDa invariant surface glycoprotein, putative	2
	-2,81	HSP	Tb10.26.1080, heat shock protein 83	13
	-2,79	HSP	Tb10.26.1080, heat shock protein 83	13
	-2,7	HSP	Tb07.26A24.660, chaperone protein DNAJ, putative	
	-2,57	sonstige	Tb07.22O10.180, hypothetical protein, conserved	
	-2,5	HSP	Tb10.26.1080, heat shock protein 83	13
Gesamt-RNA: Durch Dipyridamol reprimierte Gene	4 h Dipy.	Kategorie	Gen	#
	-3,79	Genexpression	Tb08.29O9.340, lysyl-tRNA synthetase, putative	2
	-3,29	VSG	Tb11.51.0005, variant surface glycoprotein (VSG), putative	
	-2,56	sonstige	Tb11.01.0580, glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, putative	
Gesamt-RNA: Durch Dipyridamol reprimierte Gene	8 h Dipy.	Kategorie	Gen	#
	-6,08	hypothetischer ORF	Tb06.1118.660, transposase of Tn10	
	-3,02	VSG	VSG pseudogene, telomeric repeats	

Tab. 7: Nach Dipyridamolzugabe  $\geq 2,5$ -fach differenziell regulierte Gene aus Abb. 34

Die Anzahl der Mehrfachnennungen innerhalb dieses Experiments ist in der Spalte rechts (#) angegeben. Induktion ist durch positive, Repression durch negative Werte dargestellt.





**Abb. 35: Änderungen der Genexpression nach Inkubation mit Dipyridamol für 2; 4 oder 8 h**

Die gerundeten Faktoren der am stärksten regulierten Sequenzen sind angegeben (Regulationen von -1,49 bis +1,49 sind jeweils in der Kategorie  $\pm 1$  zusammengefasst). Induktion ist durch positive, Repression durch negative Werte dargestellt.

### 3.3.2.2 Schnittmenge der durch Kälte und Dipyridamol differenziell regulierten Gene

Sowohl Kälteschock als auch die Behandlung von BSF mit dem PDE-Inhibitor Dipyridamol sind Stimuli mit vielfältigen Effekten auf die Zelle. Beide Behandlungen führen ohne Zweifel auch zur Induktion genereller Stressproteine. Nach Kälteschock- bzw. Dipyridamolinduktion konnten z. T. ähnliche Auswirkungen auf BSF gezeigt werden. Beide Stimuli werden mit der Differenzierung von BSF in Verbindung gebracht. Des Weiteren wird in beiden Fällen reversibel die Aktivität der PKA-ähnlichen Kinase induziert (Kramer 2004).

Für *Saccharomyces cerevisiae* wurde mit Hilfe von Microarrayanalysen gezeigt, dass durch Kälteschock einige Komponenten des cAMP-PKA Signalweges induziert werden können (Sahara et al. 2002). Durch Vergleich der oben beschriebenen Microarray-Experimente wurde untersucht, ob möglicherweise auch bei *T. brucei* Gene sowohl kälteschockabhängig als auch nach Behandlung mit Dipyridamol reguliert werden. Die PKA-ähnliche Kinase wäre eine mögliche Komponente dieses Signalweges (siehe Abb. 44).

Eine gewisse Überschneidung differenziell regulierter Gene war aufgrund der unspezifischen Induktion von Stressproteinen durch beide Stimuli durchaus zu erwarten. Jedoch ist die festgestellte Schnittmenge sehr gering. Nur zwei der jeweils etwa 100 am stärksten regulierten Sequenzen zeigen bei beiden Stimuli differenzielle Regulation (Tb11.02.5500, glucose-regulated protein 78, putative, BiP-like und Tb11.02.1120, adenylosuccinate synthetase, putative). Zusätzlich fällt auf, dass die durch Kälteschock am stärksten induzierbaren Gene der Gruppe Prozyklin/PAG [16% in Abb. 32 (A)] bei Induktion mit Dipyridamol zu keinem der getesteten Zeitpunkte differenziell reguliert sind. Dies bestätigt die Spezifität des Kälteschockeffekts.

### 3.4 Beteiligung möglicher *trans*-Faktoren an der Kälteschockregulation von Prozyklin

Eine mögliche Beteiligung bestimmter Kandidatengene am Mechanismus der Kälteschockinduktion der Prozyklinexpression wurde genetisch untersucht. Hierfür wurde die Kälteschockinduktion in Nullmutanten oder induzierbaren RNAi-Zelllinien des entsprechenden Gens mit der des WT bzw. uninduzierten Kontrollen verglichen.

#### 3.4.1 Regulation durch die endogene RNAi-Maschinerie?

*T. brucei* besitzt einen funktionellen RNAi-Mechanismus. Eine biologische Funktion ist bislang jedoch nicht bekannt. Inwiefern die endogene RNAi-Maschinerie in *T. brucei* an der Kälteschockinduktion von *EP1* beteiligt ist, wurde getestet, indem das Luciferase Reportergen (Konstrukt pGAPRONE WT.Luc BLE) stabil in eine BSF Zelllinie mit Nullmutation des *ago1* Gens (Janzen et al. 2006) integriert wurde. Das *AGO1* Gen ist für den RNAi-Mechanismus in *T. brucei* essenziell.

Die Reporterexpression zweier unabhängiger Populationen wurde durch Kälteschock 78 bzw. 82-fach induziert. Dies entspricht dem mit der MITat 1.2 WT 3'UTR Zelllinie (85-fach) gemessenen Effekt (siehe Tab. 8). Eine Beteiligung der RNAi-Maschinerie an der Kälteschockregulation wird dementsprechend ausgeschlossen.

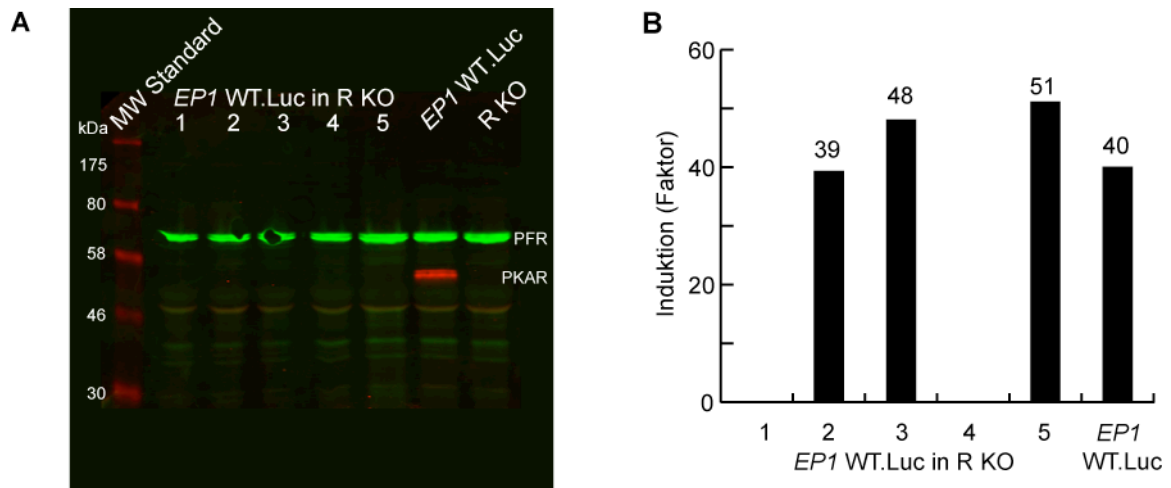
genetischer Hintergrund	RLUx(10 s <sup>-1</sup> )/ 2,5x10 <sup>5</sup> Zellen (37 °C)	RLUx(10 s <sup>-1</sup> )/ 2,5x10 <sup>5</sup> Zellen (16 h 20 °C)	Induktion (Faktor)
WT	1087	92359	85
<i>Δago1/Δago1</i> (Pool 1)	722	56848	79
<i>Δago1/Δago1</i> (Pool 2)	785	64250	82

Tab. 8: Die endogene RNAi-Maschinerie ist für die Kälteschockinduktion nicht erforderlich.

Zwei unabhängige Reporterzelllinien mit Nullmutation des für RNAi essenziellen *ago1* Gens wurden untersucht.

#### 3.4.2 Kälteschockinduktion ist unabhängig von der PKA-ähnlichen Kinase

Die Aktivität der PKA-ähnlichen Kinase in *T. brucei* ist spezifisch in BSF durch Kälteschock induzierbar (Kramer 2004). Um die direkte Beteiligung der PKA-ähnlichen Kinase an der kälteschockabhängigen Induktion der Prozyklinexpression zu untersuchen, wurde das Luciferase Reportergen unter Kontrolle der WT *EP1* 3'UTR in den Prozyklinloкус einer MITat 1.2 Zelllinie mit *pkar* Nullmutation (MITat 1.2 R KO Klon 2.1, C. Krumbholz dieses Labor, unpublizierte Daten) integriert. Zunächst wurde die hergestellte Zelllinie (MITat 1.2 *EP1* WT.Luc in R KO) durch Western Blot mit anschließender Immundetektion verifiziert [siehe Abb. 36 (A)]. Wie zu erwarten, verschwindet das PKAR Signal (ca. 56 kDa), während es bei der *EP1* WT.Luc Kontrolle detektiert wird.



**Abb. 36: Kälteschockinduktion ist unabhängig von der PKA-ähnlichen Kinase**

(A) Kontrolle der *pkar* Nullmutation durch Western Blot. Proteinextrakte äquivalent zu  $5 \times 10^6$  Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteine wurden anschließend durch anti-PKAR Antikörper (Schulte zu Sodingen 2000) (rot) bzw. anti-PFR A/C Antikörper (Kohl et al. 1999) (grün) als Ladekontrolle immunodetektiert. Die Visualisierung der Banden erfolgte am Odyssey IR Scanner. Aufgetragen wurden (von links nach rechts) NEB Prestained Protein Marker; MITat 1.2 *EP1* WT.Luc in R KO Pools 1-5; MITat 1.2 *EP1* WT.Luc; MITat 1.2 R KO. (B) Induktionsfaktoren der Luciferaseexpression nach Kälteschock (10 h; 20 °C). Bei den Pools 1 und 4 wurde keine Messung der Luciferaseaktivität durchgeführt.

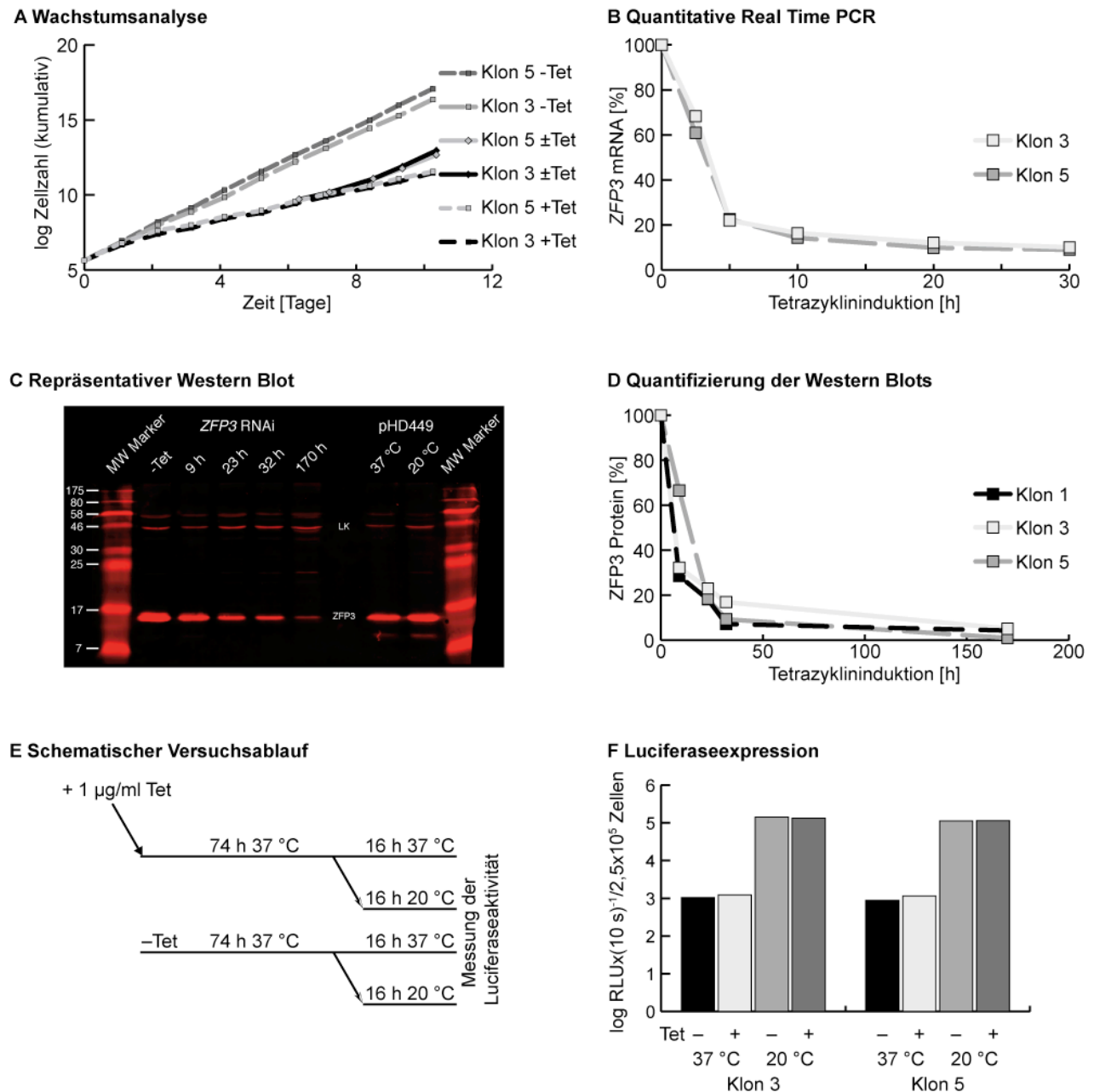
Die Quantifizierung der Luciferaseexpression von drei unabhängigen Pools [siehe Abb. 36 (B)] zeigt, dass auch in *pkar* Nullmutanten der Kälteschock zur Induktion der Reporterexpression führt. Die gemittelten Induktionsfaktoren verschiedener Pools entsprechen mit  $44,5 (\pm 5,9)$  dem, parallel für die WT.Luc Kontrolle gemessenen 40-fachen Anstieg. Die im Vergleich zu den oben beschriebenen Messungen verringerte Induktion der WT.Luc Kontrolle (40-fach statt 85-fach), ist auf die kürzere Inkubation unter Kälteschockbedingungen zurückzuführen (10 statt 16 h). Eine essenzielle Beteiligung der in ihrer Aktivität ebenfalls durch Kälteschock induzierbaren PKA-ähnlichen Kinase (Kramer 2004) an der Kälteschockregulation von Prozyklin kann somit ausgeschlossen werden.

### 3.4.3 Kälteschockinduktion ist unabhängig von ZFP3

ZFP3 ist das bisher einzige Protein, für das eine Bindung an die Prozyklin 3'UTR gezeigt werden konnte (Paterou et al. 2006; Walrad et al. 2009). Da für die beiden anderen beschriebenen Proteine dieser Gruppe (ZFP1 und ZFP2) bereits Effekte auf die Differenzierung von *T. brucei* gezeigt werden konnten (Hendriks et al. 2001; Hendriks und Matthews 2005), wurde mit Hilfe eines HMM Profils in der *T. brucei* Genomdatenbank nach weiteren Proteinen dieser Gruppe gesucht. Neben den für die Bildung des HMM Profils zu Grunde liegenden Sequenzen (ZFP1-3), konnten jedoch keine zusätzlichen Proteine mit entsprechender Domänenstruktur gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Der Einfluss von ZFP3 als mögliches *trans*-Element bei der kälteschockabhängigen Regulation von Prozyklin wurde durch induzierbares RNAi gegen das *ZFP3* Gen überprüft. Dazu wurde auf Basis des Plasmids pHD615 (Biebing et al. 1997) ein Haarnadel RNAi Konstrukt kloniert (mfold Berechnung siehe elektronischer Anhang 6.7) und stabil in eine dafür hergestellte BSF Zelllinie integriert, die sowohl den Tet-Repressor, als auch das Luciferase Reportergen im Prozyklinloкус exprimiert (MITat 1.4 pHD449 pGAPRONE WT.Luc).

In Abb. 37 (A) sind die Wachstumskurven zweier klonaler *ZFP3* RNAi Zelllinien angegeben. Etwa 24 h nach Induktion von RNAi mit 1 µg/ml Tet konnte ein deutlicher Wachstumsphänotyp festgestellt werden. Die Verdopplungszeit der induzierten Zelllinie erhöhte sich auf etwa 14,5 h und blieb anschließend für die Dauer der Untersuchung (10 Tage) konstant (uninduziert ca. 6,5 h). Die bei RNAi Experimenten nach einigen Tagen häufig beobachtete Verringerung der Verdopplungszeit durch Gegenregulation der Zellpopulation und Selektion auf schnelles Wachstum wurde hier nicht beobachtet. Dass es sich um einen spezifischen, durch die Induktion von RNAi hervorgerufen Effekt handelt wurde zusätzlich bestätigt, indem eine Subpopulation nach siebentägiger Tet-Induktion zweimal in HMI9 gewaschen und anschließend ohne Tet weiterinkubiert wurde. Innerhalb eines Tages wurden in dieser Zelllinie wieder Verdopplungszeiten erreicht, die mit der uninduzierten Kontrolle vergleichbar waren.

Die Abnahme der mRNA nach Induktion von RNAi wurde mit quantitativer Real Time PCR überprüft. Die Effizienz dieser Real Time PCR erreichte 99,9%, der Korrelationskoeffizient der Standardkurve lag bei 0,997. Die interne Normierung erfolgte über das oben beschriebene *TERT* Referenzgen. In Abb. 37 (B) ist die relative mRNA-Expression zweier klonaler Reporterzelllinien nach Induktion von RNAi dargestellt. Die Expressionsniveaus beider Klone vor Induktion wurden unabhängig voneinander auf 100% gesetzt. Beide Klone zeigen nach Induktion von RNAi eine rasche Abnahme der mRNA-Menge. Bereits 5 h nach Induktion wurden nur noch 22% der ursprünglichen mRNA-Menge nachgewiesen, nach 30 h ist die Expression beider Klone auf jeweils 10% reduziert. Auf Proteinebene wurde die Abnahme von *ZFP3* nach Induktion von RNAi durch Western Blot mit anschließender Immundetektion verifiziert [siehe Abb. 37 (C und D)]. In allen drei untersuchten Klonen ist nach Induktion von RNAi eine deutliche Abnahme festzustellen. Nach 23 h wird nur noch ca. 20% der ursprünglichen Proteinmenge gemessen. Im weiteren Verlauf nimmt die Proteinmenge auf bis zu 1-5% der uninduzierten Kontrolle ab. Die Repression durch RNAi (95-99%) ist deutlich stärker als die in vorangegangenen Untersuchungen [(Paterou et al. 2006) maximal 60%]. Durch quantitativen Western Blot wurde zusätzlich gezeigt, dass die *ZFP3*-Expression nicht durch Kälteschock induzierbar ist [siehe Abb. 37 (C)]. Nach Prä-Induktion mit Tet für bis zu 74 h, die der Kälteschockinduktion (16 h 20 °C) voraus ging, wurde die Luciferaseexpression gemessen [siehe Abb. 37 (E und F)]. In keiner der insgesamt sieben getesteten klonalen Zelllinien (nur zwei sind dargestellt), war nach Induktion von RNAi ein Effekt auf die Kälteschockinduktion der Reporterexpression festzustellen.



**Abb. 37: Die Kälteschockinduktion durch *EP1* 3'UTR ist unabhängig von ZFP3**

(A) Wachstum klonaler ZFP3-RNAi Reporterzelllinien (MITat 1.4 pHD449 pGAPRONE WT.Luc pHD616 ZFP3 Puro). Nach Induktion von RNAi mit 1 µg/ml Tetrazyklin (+Tet) ist ein Wachstumsphänotyp erkennbar [Verdopplungszeit: ca. 14,5 h; uninduzierte Kontrolle (-Tet): ca. 6,5 h], der nach siebentägiger Induktion durch Entfernung von Tet reversibel ist ( $\pm$ Tet). (B) Relative Quantifizierung der *ZFP3* mRNA nach Induktion von RNAi. Das *TERT* Referenzgen diente zur internen Normierung. Die Auswertung erfolgte nach Livak und Schmittgen (2001). mRNA-Expressionen vor Tet-Induktion wurden auf 100% festgesetzt. (C) Repräsentativer Western Blot nach Induktion von RNAi gegen ZFP3 (14 kDa). Zellextrakte (äquivalent zu  $1,5 \times 10^6$  Zellen) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Proteinbanden wurden durch anti-*TbZFP3* Antikörper (Paterou et al. 2006) immunodetektiert. Die Visualisierung der Banden erfolgte am Odyssey IR Scanner. Eine unspezifisch detektierte Bande bei ca. 42 kDa diente als interne Ladekontrolle (LK). Aufgetragen wurden (von links nach rechts): NEB Prestained Protein Marker; uninduzierte Kontrolle; vier Zeitpunkte nach Induktion von RNAi; Ausgangszelllinie (MITat 1.4 pHD449) ohne RNAi-Vektor inkubiert bei 37 °C bzw. für 16 h bei 20 °C. (D) Quantitative Analyse von Western Blots dreier unabhängiger Klone analog zu (C). (E) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Kälteschockinduktion. 74 h nach Induktion von RNAi gegen *ZFP3* wurde eine Subpopulation für weitere 16 h bei 20 °C, der Rest unter Standardbedingungen (37 °C) inkubiert, bevor die Reporterexpression gemessen wurde (F). Als Kontrollen dienten Parallelkulturen ohne Tet-Induktion. Beide Klone wurden mit vergleichbaren Ergebnissen im Duplikat untersucht.

### 3.4.4 RNAi gegen CSD-Proteine hat keinen Effekt auf die Kälteschockinduktion

Es wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der Prozyklinregulation und CSD-Proteinen postuliert, da ein Teilbereich der Prozyklin 3'UTR (nt 181-193) eine auffallend starke Homologie zu dem Konsensusmotiv RNA-bindender CSD-Proteine aufweist (Engstler & Boshart, unpublizierte Daten). In den Genomdatenbanken der verwandten Kinetoplastiden *T. brucei*, *T. cruzi* und *Leishmania major* wurde deshalb nach Proteinen mit dieser RNA-Bindedomäne gesucht. Das bislang einzige im Genom von *T. brucei* annotierte CSD-Protein ist das RNA-bindende Protein (RBP) 16 (Hayman und Read 1999), das in der HMMER-Suche als wahrscheinlichstes Ergebnis angegeben wurde (siehe Tab. 9). Auch in den beiden anderen Genomdatenbanken wurde RBP16 als zuverlässigster Treffer identifiziert. RBP16 gehört zur hochkonservierten Familie der Y-box Proteine, ist jedoch ungewöhnlicherweise im Mitochondrium lokalisiert (Hayman und Read 1999). Es bindet an RNA (Pelletier et al. 2000) und reguliert durch RNA-Editierung und -Stabilisierung posttranskriptionell die Genexpression spezifischer mitochondrieller mRNAs (Pelletier und Read 2003). In der oben beschriebenen Microarrayanalyse wurde *RBP16* als schwach durch Kälteschock reguliertes Transkript identifiziert. Neben *RBP16* konnten weitere Gene gefunden werden, die mit geringer Fehlerwahrscheinlichkeit in *T. brucei* ebenfalls für CSD-Proteine codieren.

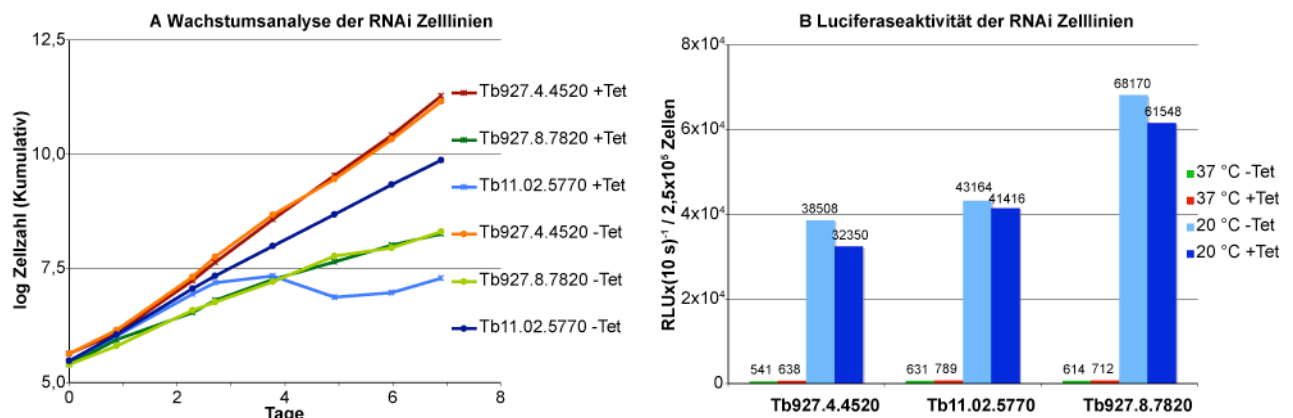
T. brucei	Nr.	Accession Nr.	Funktion	E-value	CSD Domäne	Score	RNAi
	1	Tb11.02.5770 (*)	RBP16, mitochondrielles RNA-bindendes Protein	9,2E-16	AS 17-85	6,2E-15	✓
	2	Tb927.8.7820	hypothetisches Protein, konserviert	3,8E-11	AS 270-324	6,7E-05	✓
	3	Tb927.4.4520	hypothetisches Protein, konserviert	6,3E-11	AS 269-322	9,7E-05	✓
	4	Tb927.7.3810	hypothetisches Protein, konserviert	1,8E-04	n. a.	n. a.	
T. cruzi	Nr.	Accession Nr.	Funktion	E-value	CSD Domäne	Score	
	1	Tc00.1047053506933.60	mitochondrielles RNA-bindendes Protein	4,6E-21	AS 17-85	n. a.	
	2	Tc00.1047053509007.40	hypothetisches Protein, konserviert	1,0E-11	AS 261-321	n. a.	
	3	Tc00.1047053508965.70	hypothetisches Protein, konserviert	1,0E-11	AS 261-321	n. a.	
	4	Tc00.1047053509935.20	hypothetisches Protein, konserviert	4,7E-05	AS 281-343	n. a.	
L. major	Nr.	Accession Nr.	Funktion	E-value	CSD Domäne	Score	
	1	LmjF28.0825	RBP16, RNA-bindendes Protein, putativ	1,0E-14	AS 17-85	9,6E-14	
	2	LmjF31.1340	hypothetisches Protein, konserviert	4,0E-13	AS 385-447	2,1E-05	
	3	LmjF31.1330	hypothetisches Protein, unbekannte Funktion	7,3E-06	n. a.	n. a.	
	4	LmjF14.1140	hypothetisches Protein, konserviert	5,6E-05	AS 360-425	3,4E-03	

**Tab. 9: Identifizierte Proteine mit CSD-Domäne**

Gene aus *T. brucei*, *T. cruzi* und *L. major*, die für Proteine mit CSD-Domäne codieren. Eine vorläufige Benennung ist gekennzeichnet (\*). Die vier Ergebnisse mit den geringsten Fehlerwahrscheinlichkeiten (E-value) sind angegeben. Unterstrichene Proteine zeigen besonders hohe Übereinstimmungen. Die Aminosäuren (AS) und Validität (Pfam Score) der jeweiligen CSD-Motive sind dargestellt, sofern in der Datenbank angegeben. Der Einfluss der markierten Gene (✓) auf die Kälteschockregulation wurde mittels RNAi untersucht.

Durch RNAi-vermittelte Reduktion der Genexpression sollte geklärt werden, ob die CSD-Proteine einen Effekt auf die Kälteschockvermittelte Induktion der Prozyklinexpression haben. Auf Basis des Plasmids pHD615 (Biebinger et al. 1997) wurden hierzu Haarnadel RNAi Konstrukte kloniert (mfold Berechnungen siehe elektronischer Anhang 6.7) und stabil in eine dafür hergestellte BSF Zelllinie integriert, die sowohl den Tet-Repressor, als auch das Luciferase Reportergen exprimiert (MITat 1.4 pHD449 pGAPRONE WT.Luc). Das Wachstum entsprechender Populationen  $\pm$ Tet ist in Abb. 38 (A) dargestellt.

Die Induktion von RNAi gegen die Gene Tb927.4.4520 und Tb927.8.7820 führt im getesteten Zeitrahmen zu keiner Veränderung des Wachstums. Im Gegensatz zur RNAi-Zelllinie gegen das Gen Tb927.4.4520 mit normaler Verdopplungszeit (ca. 8 h) ohne Tet-Induktion, kann in der Tb927.8.7820 RNAi-Zelllinie auch uninduziert eine deutliche Verringerung des Zellwachstums auf etwa 16 h festgestellt werden, die Verdopplungszeit der Zellen entspricht dem Wert nach Tet-Induktion. Wahrscheinlich aufgrund der bereits vor Induktion vorhandenen, basalen Expression („leaky expression“), die bei dem verwendeten RNAi System zwar vergleichsweise gering- aber unvermeidlich ist, da die Zelllinien nach stabiler Transfektion des RNAi-Vektors auf das integrierte Plasmid selektioniert werden müssen. 72 h nach Zugabe von 1 µg/ml Tet zum Kulturmedium führt das RNAi gegen Tb11.02.5770 (*RBP16*) zu einem gravierenden Wachstumsphänotyp. Ein vergleichbares Experiment konnte bereits für PCF zeigen, dass *RBP16* essenziell für das Zellwachstum ist (Pelletier und Read 2003). Auch hier setzte der Phänotyp mit einer Verzögerung von etwa 48 h ein.



**Abb. 38: Analyse von Proteinen mit CSD-Domäne**

Wachstumsanalyse (A) und Reporterepression (B) nach Induktion (1 µg/ml Tet) von RNAi gegen Proteine mit CSD-Domänen.

Um den Einfluss der drei Proteine mit CSD-Domäne auf die Prozyklinregulation zu überprüfen, wurden nach 48 h Subpopulationen der induzierten Zellen sowie der Kontrollpopulation einem zusätzlichen Kälteschock (16 h 20 °C) ausgesetzt [analog zu Abb. 37 (E)]. Abb. 38 (B) zeigt, dass die Reportergenexpression auch nach RNAi gegen Tb927.4.4520, Tb927.8.7820 bzw. Tb11.02.5770 noch durch Kälteschock induziert werden kann. Die gemessenen RLU-Werte sind bei den drei kälteschockinduzierten Zelllinien nach Induktion von RNAi nur unwesentlich geringer als die der uninduzierten Kontrolle (20 °C -Tet). Auch die bei 37 °C inkubierten Zelllinien exprimieren vergleichbare Mengen an Luciferase. Ein Zusammenhang zwischen der Kälteschockregulation des Prozyklings und den in *T. brucei* identifizierten CSD-Proteinen konnte nicht festgestellt werden. Die negativen RNAi-Daten besitzen jedoch wenig Aussagekraft, da das RNAi mangels Antikörper nicht kontrolliert werden konnte.

### 3.5 Analyse des Phosphoproteoms

#### 3.5.1 *In vivo*-Markierung von Trypanosomen mit $^{32}\text{P}$

Um differenzielle Proteinphosphorylierungen sichtbar machen zu können, die Teile von Signaltransduktionskaskaden nach verschiedenen Stimuli darstellen, wurde eine Methode etabliert, um diese Ereignisse in *T. brucei* *in vivo* mit  $^{32}\text{P}$  zu markieren (siehe Abb. 39). Radioaktives  $^{32}\text{P}$  wird in Form von Trägermaterial-freiem Orthophosphat im Medium appliziert und von Trypanosomen aufgenommen. Intrazellulär wird daraus  $\gamma[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  hergestellt, das wiederum bei der Phosphorylierung von Proteinen sein  $^{32}\text{P}$  überträgt. Im Vergleich zu den nicht-radioaktiven Nachweismethoden für Phosphoproteine durch Farbstoffe wie Pro-Q Diamond (Steinberg et al. 2003) oder Phos-tag (Kinoshita et al. 2004) ist die Sensitivität der Proteindetektion nach Einbau von  $^{32}\text{P}$  deutlich höher. Da die im Fokus dieses Projekts stehenden Signalmoleküle möglicherweise wenig abundant sind, ist dies ein essenzieller Vorteil. Weiterhin ist es möglich, durch Markierung mit  $^{32}\text{P}$  rasche Veränderungen der Proteinphosphorylierungen in der Zelle zu verfolgen. Der Nachweis dynamischer Änderungen von Proteinphosphorylierungen als Folge von verschiedenen Stimuli ist für die Analyse von Signaltransduktion weitaus interessanter als die bloße Darstellung der Gesamtheit aller Phosphoproteine. Diese Methode wurde bei Trypanosomatiden bislang nicht beschrieben. Verschiedene Parameter mussten deshalb im Rahmen dieser Arbeit optimiert werden.

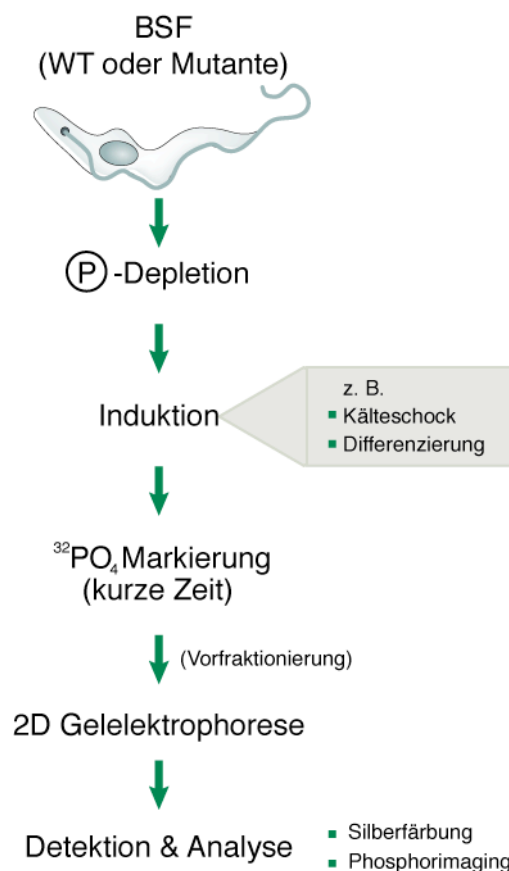
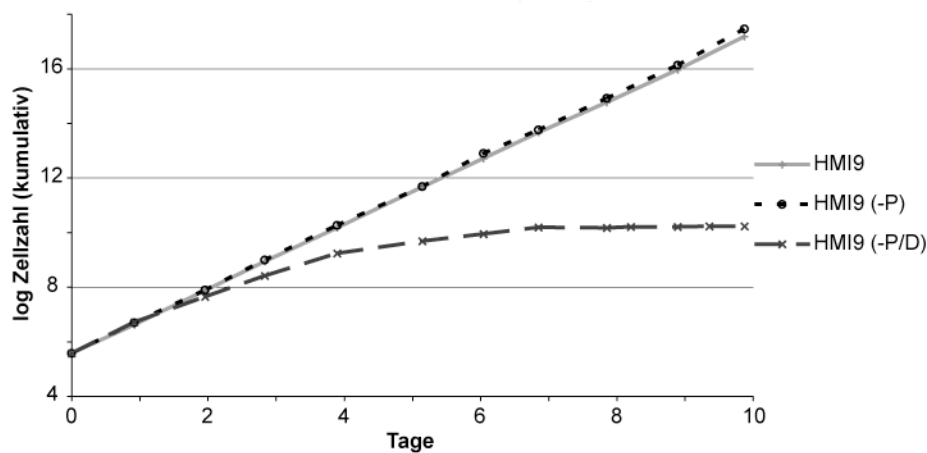


Abb. 39: Schematisierter Ablauf der *in vivo* Markierung von *T. brucei* BSF mit  $^{32}\text{P}$



### 3.5.1.1 Phosphatdepletion

Die Erfahrungen mit Phosphatdepletion bei Markierungsexperimenten in anderen Organismen sind sehr unterschiedlich. Je nach Zelltyp kann dieser Schritt essenziell oder überflüssig sein. Für *T. brucei* erwies es sich als vorteilhaft, die Kultur vor der Markierung über Nacht in phosphatfreiem Medium (siehe Anhang 6.6) zu inkubieren, das mit 10% dialysiertem FBS komplementiert wurde [siehe Tab. 10 (A)]. Innerhalb dieser Zeit wurde kein Wachstumsunterschied festgestellt. Erst nach längerer Inkubation steigt die Verdopplungszeit deutlich an (siehe Abb. 40). Durch Austausch des Mediums gegen Standard-HMI9 nach 10 Tagen wurden innerhalb von 24 h wieder annähernd normale Verdopplungszeiten (ca. 10 h) erreicht (Daten nicht gezeigt), was verdeutlicht, dass es sich hierbei tatsächlich um einen Effekt durch das Medium handelt. Die Verwendung von dialysiertem Serum in Standardmedium führte ebenfalls nur zu geringfügigem Ansteigen der Verdopplungszeit.

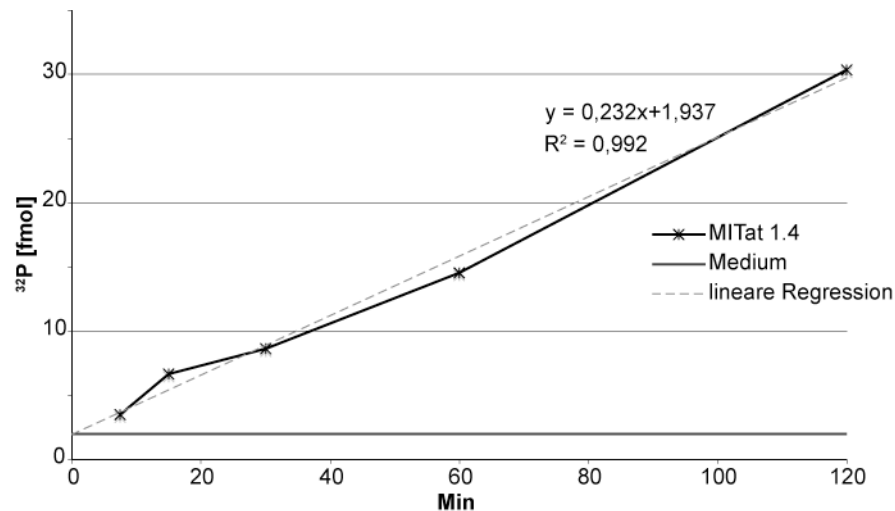


**Abb. 40: Zellwachstum nach Phosphatdepletion**

Wachstumskurven von MITat 1.2 BSF in HMI9/10% FBS, phosphatfreiem HMI9/10% FBS (-P) bzw. phosphatfreiem HMI9/10% dialysiertes FBS (-P/D). Zum Zeitpunkt 0 wurden alle Kulturen zweimal in dem entsprechenden Medium gewaschen. Die Verdopplungszeit der Kulturen in HMI9 und HMI9 (-P) beträgt ca. 6 h. Bei Inkubation in HMI9 (-P/D) ist nach etwa 48 h deutlich verlangsamtes Wachstum der Zellkultur festzustellen.

### 3.5.1.2 Zeitverlauf des Einbaus

In einem Zeitverlauf-Experiment wurde der Einbau von Radioaktivität in logarithmisch wachsende MITat 1.2 BSF gemessen. Im getesteten Zeitfenster steigt dieser linear an (siehe Abb. 41). Eine Kontrollmessung mit Medium (ohne Zellen) das für 2 h mit der gleichen Menge an  $^{32}\text{P}$  (Orthophosphat) inkubiert wurde, zeigt den Hintergrund an. Die lineare Regressionsgerade und der Hintergrundwert schneiden die Y-Achse jeweils bei etwa 2 fmol  $^{32}\text{P}$  (entspricht etwa 40000 cpm). Aus der Geradengleichung der Regressionsgerade errechnet sich für die getesteten Bedingungen eine mittlere Einbaurrate von  $2,7 \times 10^{-5}$  fmol  $^{32}\text{P}$  pro Zelle und Minute. Während nach längerer Einbauzeit erwartungsgemäß eine größere Anzahl von Proteinen und vergleichsweise stärkere Signale zu detektieren sind, werden bei kürzeren Inkubationszeiten die frühesten und somit spezifischen Phosphorylierungsunterschiede nachgewiesen. Für die Identifikation differenzieller Proteinphosphorylierungen bei verschiedenen Konditionen muss die optimale Markierungsdauer deshalb jeweils experimentell optimiert werden.

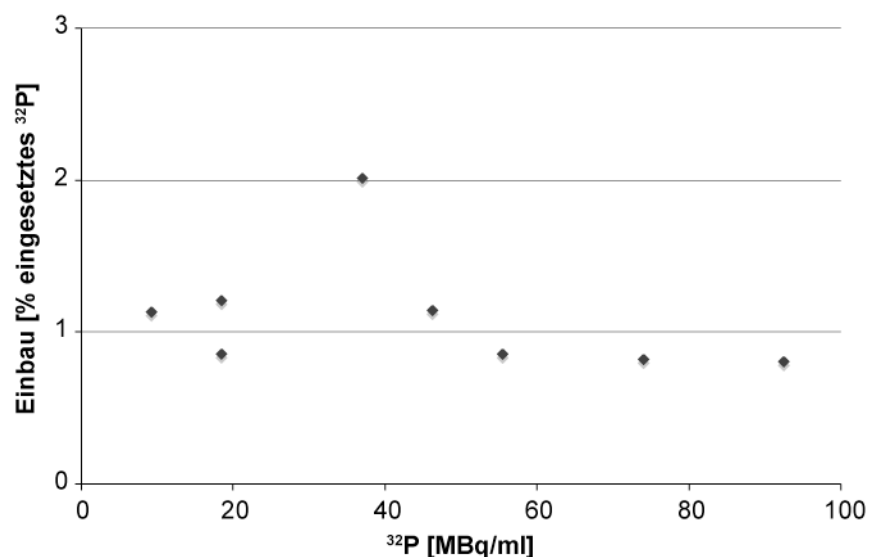


**Abb. 41: Zeitverlauf des Einbaus von  $^{32}\text{P}$**

Zeitverlauf-Experiment zur metabolischen Markierung von Phosphoproteinen in *T. brucei*.  $8 \times 10^4$  BSF Zellen in 40  $\mu\text{l}$  Medium sowie eine Medium-Kontrolle ohne Zellen wurden mit je 18,5 MBq/ml  $^{32}\text{P}$  (Orthophosphat) inkubiert, wie in 2.2.1.8 beschrieben. Nach TCA-Präzipitation wurden die Proteinpellets in je 20  $\mu\text{l}$  Laemmli Auftragspuffer resuspendiert und Aliquots im Flüssigszintillationszähler gemessen. Mit Hilfe der linearen Regressionsgeraden wurde die Einbaurrate in fmol  $^{32}\text{P}$  pro Zelle und Minute berechnet.

### 3.5.1.3 Menge an $^{32}\text{P}$

Die Sensitivität der Methode wurde durch Markierungsexperimente mit verschiedenen Mengen an  $^{32}\text{P}$  (9,25-92,5 MBq/ml) optimiert (siehe Abb. 42). Unabhängig von der eingesetzten Menge wurden im Mittel 1,1% ( $\pm 0,4$ ) der Gesamtmenge in präzipitierbares Material eingebaut. Für die Markierungsreaktionen in weiteren Experimenten wurden 37-55,5 MBq/ml  $^{32}\text{P}$  (Orthophosphat) eingesetzt. Nach weiterer Optimierung der experimentellen Durchführung und je nach Inkubationszeit wurden in folgenden Experimenten bis zu 3% des radioaktiven Materials eingebaut.



**Abb. 42: Optimierung der Menge an eingesetztem  $^{32}\text{P}$**

Abhängigkeit der Markierungsreaktion von der eingesetzten Menge an  $^{32}\text{P}$  (Orthophosphat).  $8 \times 10^4$  BSF Zellen wurden in 40  $\mu\text{l}$  Medium mit unterschiedlichen Mengen (9,25-92,5 MBq/ml)  $^{32}\text{P}$  für 2 h inkubiert, wie in 2.2.1.8 beschrieben. Nach TCA-Präzipitation wurden die Proteinpellets in je 20  $\mu\text{l}$  Laemmli Auftragspuffer resuspendiert und Aliquots im Flüssigszintillationszähler gemessen.

Die Messung im Flüssigszintillationszähler erlaubt jedoch keine Differenzierung zwischen Einbau von  $^{32}\text{P}$  in Nukleinsäuren oder in Proteine. In anderen Organismen wurden in vergleichbaren Markierungsexperimenten üblicherweise etwa 1% Einbau in Proteine erreicht (Ausubel et al. 1995). Nach elektrophoretischer Auftrennung der Zelllysate im 2D Gel wird die Detektion von radioaktiv markierten Phosphoproteinen ermöglicht. Da die Markierungsreaktion für Experimente  $\pm$  Stimulus gemeinsam im gleichen Reaktionsgefäß durchgeführt wird und die Proben erst anschließend zur kurzzeitigen Induktion in unabhängige Reaktionsgefäße aufgeteilt werden, haben die beobachteten Schwankungen bei der Markierungseffizienz keine Auswirkung auf das Ergebnis.

#### 3.5.1.4 Zelldichte in Markierungsreaktion

Um die in Markierungsexperimente einzusetzende Menge an  $^{32}\text{P}$  (Orthophosphat) zu minimieren, wurden die Reaktionen in möglichst kleinen Volumina durchgeführt. In Kultur wurde eine Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml nicht überschritten, um dichteabhängige Veränderungen zu vermeiden. Für die Markierungsreaktionen wurden dennoch durch Zentrifugation und Resuspendieren in geringeren Volumina HMI9 –P/D verschiedene Zelldichten erzeugt, um die optimale Zelldichte im Markierungsansatz zu ermitteln. Da die Inkubation nur für kurze Zeit und in frischem Medium erfolgt, werden keine dichteabhängigen Sekundäreffekte erwartet. Die besten Markierungsergebnisse (etwa 3% Einbau) wurden mit einer Zelldichte von  $10^7$  Zellen/ml erreicht [siehe Tab. 10 (B)]. Höhere Zellzahlen führten zu geringeren Einbauraten. Die Markierung in Reaktionsansätzen mit geringerer Zelldichte wäre möglicherweise noch effizienter, wurde aber nicht durchgeführt. Für die Visualisierung der Proteine durch Silberfärbung nach gelelektrophoretischer Auftrennung wäre eine geringere Zellzahl nicht ausreichend. Die Vergrößerung des Volumens bei gleichbleibender Zellzahl im Markierungsansatz ist aufgrund der dafür erforderlichen Mengen an  $^{32}\text{P}$  nicht praktikabel. Alle weiteren Markierungsreaktionen wurden dementsprechend mit einer Dichte von  $10^7$  Zellen/ml durchgeführt.

#### 3.5.1.5 Markierung von stumpy BSF

Die hier beschriebene Methode zur radioaktiven *in vivo*-Markierung von Proteinen mit  $^{32}\text{P}$  wurde zunächst für den Nachweis differenzieller Proteinphosphorylierungen logarithmisch wachsender BSF optimiert. Die Markierung des von der Zelldichte abhängigen und im Zellzyklus arretierten stumpy Stadiums würde zusätzlich die Untersuchung von Änderungen bei der Differenzierung von BSF zu PCF ermöglichen. Aufgrund einiger Unterschiede im Vergleich zu pleomorphen stumpy Zellen, werden entsprechende monomorphe Zellen korrekter als stumpy-ähnliche Zellen bezeichnet. Ohne zusätzliche Anpassungen konnten mit der oben beschriebenen Methode auch stumpy-ähnliche Zellen mit  $^{32}\text{P}$  (Orthophosphat) markiert werden [siehe Tab. 10 (C)].

Die Protein-Tyrosin Phosphatase 1B (PTP1B) ist eine der wenigen bislang bekannten Komponenten dieses Signaltransduktionsweges. Sowohl die chemische Inhibierung, als auch RNAi gegen *PTP1B* führen zur spontanen Differenzierung von stumpy Trypanosomen (Szoor et al. 2006). Durch die nun möglichen Markierungsexperimente mit stumpy-ähnlichen Zellen, deren Differenzierung *in vitro* induziert wird und den Vergleich mit entsprechenden Zellen die durch Inkubation mit dem *PTP1B* Inhibitor BZ3 (Wiesmann et al. 2004) zur Differenzierung gebracht werden, können möglicherweise weitere Phosphoproteine identifiziert werden, die ebenfalls Teil dieser Signaltransduktionskaskade(n) sind.

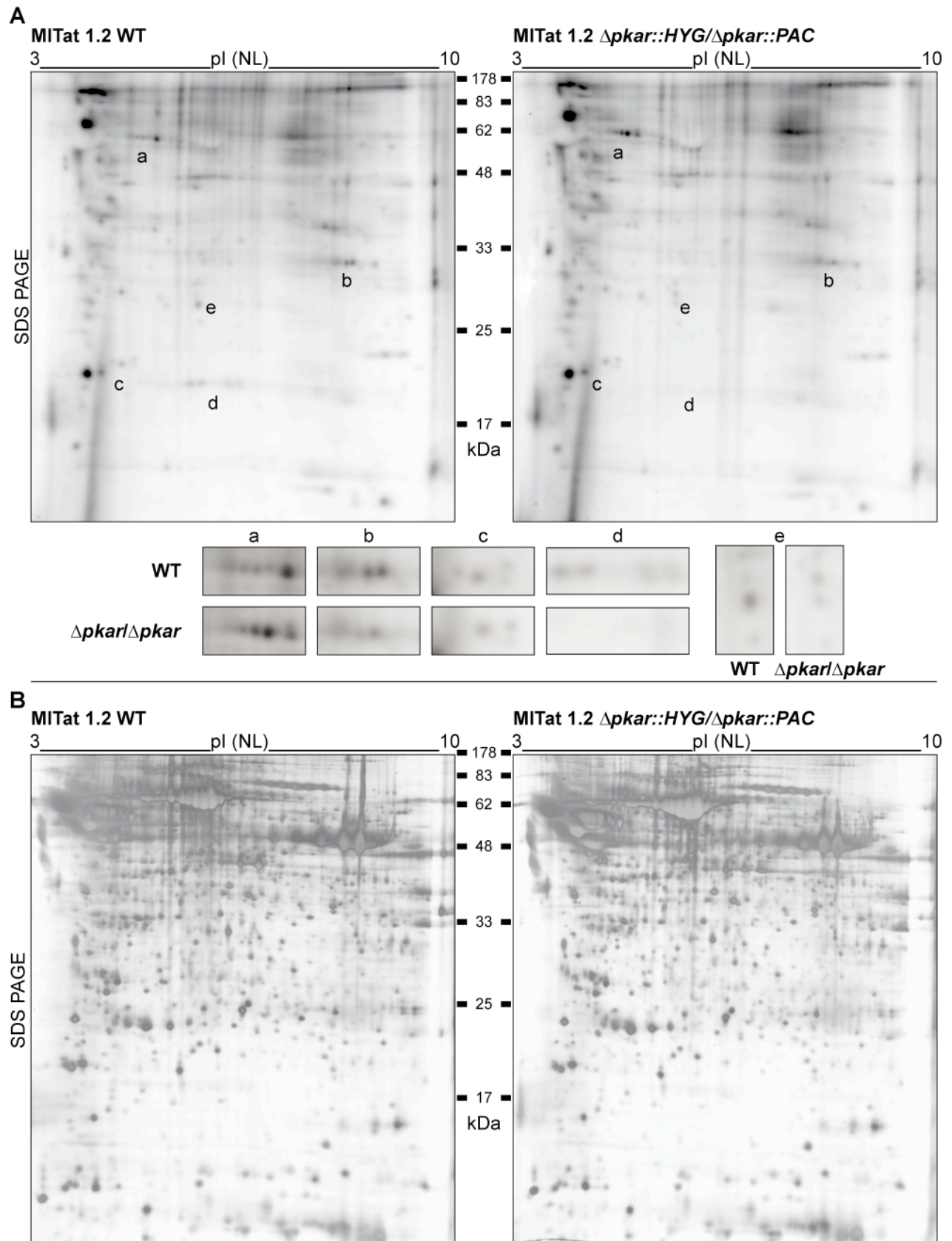
A		B		C	
Phosphat-Depletion (h)	Einbau von $^{32}\text{P}$ (%)	Zellzahl/ml in Markierungsreaktion	Einbau von $^{32}\text{P}$ (%)	Zellzahl/ml in Kultur	Einbau von $^{32}\text{P}$ (%)
0	0,1	$1,0 \times 10^7$	2,9	$4,3 \times 10^5$	1,9
2	0,6	$2,5 \times 10^7$	1,1		2,9
16	1,4	$5,0 \times 10^7$	1,7	$2,0 \times 10^6$	2,6
		$7,5 \times 10^7$	1,5		3,4
				$3,3 \times 10^6$	4,2
					3,9

**Tab. 10: Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Markierung mit  $^{32}\text{P}$**

Einbau von  $^{32}\text{P}$  (Orthophosphat) in *T. brucei* BSF nach 2 h Inkubation in verschiedenen Markierungsexperimenten: (A) Markierung von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml mit 46,25 MBq/ml  $^{32}\text{P}$  ohne bzw. mit vorausgegangener Phosphatdepletion; (B) Markierung von Kulturen mit unterschiedlichen Zelldichten in den Markierungsreaktionen (ausgehend von derselben, logarithmisch wachsenden Kultur einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen/ml) mit 18,5 MBq/ml  $^{32}\text{P}$  nach Phosphatdepletion für 15 h und (C) Markierung von Kulturen mit unterschiedlichen Ausgangszelldichten (bei jeweils von  $10^7$  Zellen/ml in der Markierungsreaktion) mit 37 MBq/ml  $^{32}\text{P}$  nach Phosphatdepletion für 15 h.

### 3.5.2 Differenzielle Phosphorylierungen der *pkar* Nullmutante

Zur Validierung der Methode zur radioaktiven *in vivo* Markierung von Phosphoproteinen wurde ein Experiment zum Vergleich von WT und  $\Delta pkar/\Delta pkar$  (C. Krumbholz dieses Labor, unpublizierte Daten), BSF durchgeführt. Die Deletion der R-Untereinheit hat eine stark verringerte Aktivität der PKA-ähnlichen Kinase (Katalytische Untereinheiten C1-3) zur Folge. Nach Detektion der Signale auf Phosphor Speicherfolien, erfolgte die Bildanalyse mit dem Programm PDQuest. Die Intensität und Anzahl der radioaktiv markierten Proteine nimmt erwartungsgemäß nach längerer Markierung zu. In Abb. 43 (A) sind exemplarisch die Autoradiogramme nach 30 min Einbau dargestellt. Mit dem Programm PDQuest konnten etwa 200 (z. T. schwache) Proteinpunkte automatisch detektiert werden. Die Zuordnung der entsprechenden Punkte in den verschiedenen Gelen war aufgrund der Reproduzierbarkeit der Methode leicht möglich. Im pH-Bereich von 3-10 sind fünf differenziell phosphorylierte Proteine, die in mindestens einem weiteren, unabhängigen Experiment bestätigt wurden hervorgehoben (a-e). Die Silberfärbung des Gesamtproteins der entsprechenden Gele [siehe Abb. 43 (B)] dient als Qualitätskontrolle und verdeutlicht die Reproduzierbarkeit.



**Abb. 43: Differenzielle Proteinphosphorylierungen von WT und *pkar* Nullmutante**

Jeweils  $10^7$  BSF wurden nach Phosphatdepletion für 15 h bei 37 °C für 15; 30 bzw. 60 min mit 51,8 MBq/ml  $^{32}\text{P}$  (Orthophosphat) inkubiert. Nach Präzipitation wurden die Proteine in 2D Lysepuffer gelöst und durch 2D Gelelektrophorese aufgetrennt. Die radioaktiven Gele wurden 6 Tage auf Phosphor Speicherfolien exponiert und anschließend mit dem Typhoon Variable Mode Imager eingescannt. Die Bildanalyse erfolgte mit dem Programm PDQuest. (A) zeigt exemplarisch die Autoradiogramme nach 30 min Einbau. Proteinpunkte, die in mindestens zwei unabhängigen Experimenten differenzielle Phosphorylierungen zeigten (a-e), sind auch in Vergrößerung dargestellt. (B) Silberfärbung der in (A) dargestellten Gele zur Qualitätskontrolle.

### 3.5.3 Differenzielle Phosphorylierungen nach kurzzeitiger Kälteschockinduktion

Im Gegensatz zu der Analyse der differentiellen Proteinphosphorylierungen von WT BSF und *pkar* Nullmutante, handelt es sich bei den hier zu untersuchenden Konditionen nicht um stabile Zustände. Neben der Identifikation der minimalen Markierungsdauer, zur Detektion der frühesten (spezifischen) Phosphorylierungsunterschiede (bevor diese durch Phosphorylierungen abundanterer Proteine überlagert werden), muss hier zusätzlich die optimale Dauer der Kälteschockinduktion durch Zeitverlauf-Experimente ermittelt werden. Am Beispiel des transgen exprimierten, heterologen PKA-Substrates VASP konnte exemplarisch gezeigt werden, dass dessen Phosphorylierung bereits durch kurzzeitigen Kälteschock (5-15 min) induziert wird und dieser Effekt innerhalb von etwa 30 min bei 37 °C voll reversibel ist (Bachmaier 2008). Durch die ersten 2D Gele der radioaktiv markierten Phosphoproteine von Kälteschockexperimenten im Zeitverlauf von 2,5-10 min (siehe elektronischer Anhang 6.7) konnten im Vergleich mit dem uninduzierten WT keine durch Kälteschock differentiell phosphorylierten Proteine identifiziert werden. Die Qualität der Gele wurde durch Silberfärbung der Gesamtproteine überprüft (siehe elektronischer Anhang 6.7). Weitere Zeitverlauf-Experimente mit längerer Kälteschockinduktion (Darstellung zusätzlicher Änderungen) oder kürzerer Markierungszeit (Steigerung der Spezifität der Signale) sind erforderlich, um die optimalen Bedingungen zu identifizieren.

## 4 Diskussion

### 4.1 Kälteschockregulation über die *EP1* 3'UTR

Die Prozyklin Oberflächenproteine gehören in der prozyklischen Form von *T. brucei* zu den abundantesten Proteinen überhaupt. Die strikte Regulation der Prozyklinexpression ist für Trypanosomen essenziell, da die Expression in BSF zur Erkennung durch das Immunsystem des Wirtes und schließlich zum Tod des Parasiten führen würde. Das endogene Protein ist dementsprechend in BSF bei 37 °C der Körpertemperatur des Säugerwirtes, nicht detektierbar. Es konnten jedoch im Wirtsblut anti-Prozyklin Antikörper identifiziert werden, die auf eine Expression in zumindest einigen Zellen auch im Blut hindeuten (Liu und Pearson 1987). Nach Kälteschockinduktion wird Prozyklin auch in BSF vom endogenen Locus aus exprimiert, jedoch nicht an die Oberfläche transportiert (Engstler und Boshart 2004). Die Induktion wird von der 3'UTR vermittelt (Engstler und Boshart 2004). Die für starke Expression in PCF nötigen Faktoren sind bereits in BSF vorhanden, oder werden ebenfalls durch Kälteschock unmittelbar coinduziert. Nach Kälteschock zeigt beispielsweise die  $\Delta$ LII-Mutante, im Vergleich zur Reporterlinie mit WT 3'UTR bei 37 °C einen >1000-fachen Anstieg der Reporterexpression. Das entspricht fast 35% der Expression von PCF mit WT 3'UTR. Auch in den endemischen Gebieten Afrikas, erfahren Trypanosomen spätestens in der ersten Nacht nach Aufnahme mit dem Blutmahl der Fliege, die für die Induktion nötige Absenkung der Temperatur, was die biologische Relevanz des Kälteschockeffektes unterstreicht.

Als Bottom-up Ansatz zur Aufklärung der Kälteschockregulation wurde eine umfassende Mutationsanalyse der *EP1* 3'UTR in Reporterzelllinien durchgeführt. Bislang war die 297 nt lange *EP1* 3'UTR die einzige bekannte kälteschocksensitive Sequenz. In dieser Arbeit wurde die vergleichbar starke Induktion von Reporterkonstrukten durch die 3'UTR des *GPEET* Prozyklings gezeigt (siehe Abb. 16), die eine hohe Sequenzhomologie zur *EP1* 3'UTR aufweist. Eine essenzielle Beteiligung des heterogenen Teilbereichs in Loop III an der Kälteschockinduktion, konnte somit ausgeschlossen werden. Inwiefern die weiteren regulatorischen *cis*-Elemente in der 3'UTR die Kälteschockregulation beeinflussen, wurde untersucht und mit den Auswirkungen auf die Entwicklungsregulation von BSF zu PCF verglichen. Bei der Planung sämtlicher 3'UTR-Mutationen wurde ein Kompromiss geschlossen, zwischen der exakten Mutation regulatorischer *cis*-Elemente und der Beibehaltung der Sekundärstruktur unveränderter Teilsequenzen. Diese wurden mit Hilfe des mfold Programms (Zuker 2000) *in silico* berechnet und mit dem experimentell validierten Strukturmodell von Drozd und Clayton (1999) verglichen (siehe Tab. 2). Die Gegenüberstellung der Sekundärstrukturen bei verschiedenen Temperaturen (20 °C, 27 °C, 37 °C) lieferte keine Hinweise für einen mit RNA-Thermometern bei Bakterien [zusammengefasst von Narberhaus et al. (2006)] vergleichbaren Regulationsmechanismus.

Die Effekte publizierter 3'UTR Mutationen (siehe Abb. 20) auf die Reporterexpression konnten in BSF sowie in PCF weitgehend bestätigt werden. Durch partielle Inversion des 16mers wurde gezeigt, dass bereits geringe Sequenzveränderungen (4 nt) bei gleichbleibender Sekundärstruktur ausreichen, um die 2-fache Reduktion der Expression in PCF nach kompletter Inversion des Loopbereichs (Hehl et al. 1994) zu reproduzieren (siehe Abb. 27). Der nach vollständiger Deletion des 16mers gemessene 10-fache Effekt in PCF (Furger et al. 1997) entsteht wahrscheinlich indirekt, aufgrund von weiter reichenden Veränderungen in der Sekundärstruktur. Die 2-3 -fache Reduktion der Expression nach Deletion der ersten 49 bzw. 75 Nukleotide in dieser Arbeit (siehe Abb. 31), spricht ebenfalls für eine Überschätzung des zuvor mit der  $\Delta 1-40$  Mutante gemessenen 10-fachen Effekts dieses positiven Elements in PCF. Für die  $\Delta 1-40$  Mutante wurde bereits ein Einfluss auf die Sekundärstruktur der verbleibenden 3'UTR beschrieben (Furger et al. 1997). Da derartige Veränderungen in dieser Arbeit schon bei der Planung von 3'UTR-Mutationen vermieden wurden, sind die beobachteten Effekte der  $\Delta 1-49$  und  $\Delta 1-75$  Mutanten entsprechend geringer. Dies unterstreicht die Bedeutung der in dieser Arbeit angewandten strukturkonservativen Mutationsstrategie.

Bei Vergleich der Reporterexpressionen aller in dieser Arbeit durchgeführten 3'UTR-Mutationen (siehe Abb. 23) fällt auf, dass sämtliche Mutanten in uninduzierten BSF schwache, nach Kälteschock stärkere und in PCF die stärksten Expressionen zeigen. Die Induktion der Prozyklinexpression nach Kälteschock entspricht demzufolge einer teilweisen Vorwegnahme der Entwicklungsregulation von der Blutstrom- zur prozyklischen Form und ist auf der Ebene der *cis*-Elemente nicht von dieser separierbar.

Keines der bisher beschriebenen, oder im Rahmen dieser Arbeit identifizierten 3'UTR-Elemente, hat für sich alleine auf die Induzierbarkeit der Reporterexpression nach Kälteschock gravierende Auswirkungen. Auch größere Deletionen der ersten- bzw. zweiten Hälfte der *EP1* 3'UTR zeigten noch deutliche Induzierbarkeit nach Kälteschock (>30-fach, siehe Abb. 24). Dies entkräftet die ursprüngliche Annahme eines kälteschocksensitiven *cis*-Elements in der zweiten Hälfte der *EP1* 3'UTR (Engstler und Boshart 2004) und spricht vielmehr für einen komplexen Regulationsmechanismus mit mehreren redundanten *cis*-Elementen, die über die 3'UTR verteilt sind. Es wurden deshalb systematische Mehrfachmutationen konstruiert, um Kombinationen sämtlicher 3'UTR-Bereiche, inklusive bekannter regulatorischer Elemente zu untersuchen. Den deutlichsten Effekt zeigte hierbei die gleichzeitige Deletion von drei negativen Elementen (26mer, negatives Element in Loop III, Loop IV; Konstrukt  $\Delta LII+IV$ ), durch die die Luciferaseexpression in BSF bereits bei 37 °C 78-fach ansteigt (siehe Abb. 29). Ein zusätzlicher Kälteschock induziert die Expression im Folgenden nicht stärker, als mit verschiedenen Kontroll-3'UTRs beobachtet (Engstler und Boshart, 2004; bzw. diese Arbeit). Dieser generelle Effekt ist möglicherweise durch



verlangsamte Degradation bei verringerter Temperatur erklärbar und wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Bei 37 °C reprimieren demzufolge die negativen *cis*-Elemente in den Loops II, III und IV gemeinsam die Expression. Durch Kälteschock oder gleichzeitige Deletion dieser drei negativen Elemente kann die Proteinexpression dereprimiert werden. Bei PCF ist die Prozyklinexpression bereits dereprimiert, weshalb die Mutationen der drei negativen *cis*-Elemente in dieser Kondition nur geringe Auswirkungen haben. Auch durch Kälteschock kann die Expression hier nicht zusätzlich gesteigert werden. In BSF mit generell geringerer Reporterexpression, wirken sich die Mutationen der drei negativen *cis*-Elemente (in Loop II, III und IV) stärker aus. Innerhalb dieser Elemente wurde eine Hierarchie festgestellt. Das 26mer hat den größten Effekt auf die Kälteschockregulation, gefolgt von dem in dieser Arbeit identifizierten *cis*-Element in Loop IV. Das Negative Element in Loop III hat einen zusätzlichen, jedoch schwächeren Effekt.

## 4.2 Stadienregulation über die *EP1* 3'UTR

Durch Analyse der Reporterexpressionen von 3'UTR Mutanten in BSF vor- und nach Kälteschock sowie in PCF, wurde in dieser Arbeit die Kälteschockinduktion auch mit der stadienabhängigen Prozyklinregulation verglichen. Durch die systematische Mutationsanalyse wurde hierbei das stadienspezifische Zusammenwirken verschiedener 3'UTR-Elemente erkannt. Die parallel durchgeführten Analysen von Einzel- und Mehrfachmutationen bei BSF und PCF bestätigten dabei zunächst die unabhängigen Mutationsanalysen zweier Labors, die bislang in klarem Widerspruch standen (Furger et al. 1997; Hotz et al. 1997): Im Gegensatz zu BSF, zeigt demzufolge in PCF die Mutation des 16mers nach Deletion von Loop II keinen zusätzlichen Effekt (siehe Abb. 27).

Ferner wurden auch für die beiden positiven Elemente nt 1-40 und 16mer stadienspezifische Unterschiede festgestellt (siehe Abb. 31). Einzel- und Doppelmutationen zeigen in BSF vergleichbar starke Expressionen (ca. 30% des WT). In PCF unterstützen die positiven Elemente die hohe Proteinexpression. Erst durch gleichzeitige Mutation beider positiver Elemente wird diese hier deutlich reduziert (2-6% des WT). Dies deutet auf redundante Effekte dieser beiden positiven *cis*-Elemente in PCF hin. Die Regulation der Prozyklinexpression nach Kälteschock und auch die Entwicklungsregulation zu PCF erfolgt somit nicht durch individuelle *cis*-Elemente in der 3'UTR, sondern über einen Mechanismus, bei dem z. T. redundante regulatorische Sequenzen stadienspezifisch interagieren.

In dieser Arbeit wurde mittels real time PCR auch der Einfluss des Leserahmens auf die mRNA-Abundanz bestimmt. Im Vergleich zum Prozyklin ORF, wurde mit dem Luciferase ORF in BSF ein vierfacher Anstieg der mRNA-Menge festgestellt (siehe Abb. 14). Bei vergleichbaren Analysen führte auch die Integration der *CAT* oder *GARP* Leserahmen als Reporter in den Prozyklin Locus in BSF zum Ansteigen der mRNA-Expression (Schurch et al. 1997). Da nach Integration des *LUC* ORF in PCF keine Änderung der mRNA-Abundanz festgestellt wurde, wird deutlich, dass die codierende

Region des Prozyklings nicht generell destabilisierend wirkt, sondern dass es sich vielmehr um einen stadienspezifischen Effekt handelt. Offenbar ist zusätzlich zur Prozyklin 3'UTR somit auch die codierende Region des Prozyklings an der Regulation stadienspezifischer Expressionsunterschiede beteiligt. Diese stadienspezifisch variierenden Effekte des Luciferase Reporters auf die mRNA-Expression führen möglicherweise dazu, dass in dieser Arbeit die Entwicklungsregulation auf mRNA-Ebene unterschätzt wird. In BSF bei 37 °C sowie nach Kälteschock sind die nach Ersetzen des *EP* ORF durch den *LUC* Reporter festgestellten Anstiege der mRNA-Menge jedoch vergleichbar groß. Dies unterstreicht die Validität der Aussagen zu der im Vordergrund dieser Arbeit stehenden Kälteschockinduktion verschiedener 3'UTR-Mutanten auf mRNA-Ebene und unterstützt zudem die Beobachtung von Engstler und Boshart (2004), dass der Kälteschockeffekt ausschließlich über die 3'UTR vermittelt wird.

Bislang sind in der 297 nt langen *EP1* 3'UTR fünf regulatorische *cis*-Elemente bekannt. Für die Regulation der stadienspezifischen Expression wurde zusätzlich auch die Beteiligung der codierenden Region des Prozyklings gezeigt. Diese Komplexität könnte der Grund dafür sein, dass es trotz intensivster Bemühungen in den letzten 15 Jahren nicht gelang, involvierte *trans*-Faktoren zu identifizieren, die direkt an die Prozyklin 3'UTR binden.

Bezüglich des Anteils der mRNA-Stabilität an der entwicklungsabhängigen Prozyklinregulation sind die bisher publizierten Daten widersprüchlich. Einerseits gibt es Hinweise die zeigen, dass vor allem die mRNA-Abundanz beeinflusst wird (Clayton und Hotz 1996). Hingegen können andere Labors die Expressionsunterschiede nur teilweise (Wilson et al. 1999) bzw. kaum (Furger et al. 1997; Schurch et al. 1997) durch die Regulation auf mRNA-Ebene erklären. Nach Kälteschock wurde mit der WT *EP1* 3'UTR in dieser Arbeit eine lediglich vierfache Induktion der mRNA-Abundanz gezeigt. Im Vergleich zu der 85-fachen Induktion der Reporteraktivität stellt sie nach unseren Ergebnissen somit nur einen untergeordneten Anteil der Gesamtregulation dar (siehe Abb. 23). Auch die Entwicklungsregulation wird nach den Ergebnissen dieser Arbeit durch die mRNA-Stabilität nur zum geringen Teil erklärt. Dass die Prozyklin 3'UTR die Expression sowohl über die mRNA-Abundanz, als auch auf Translationsebene reguliert, ist keine Überraschung. Bei der Translationsregulation werden Effekte auf die Initiation, Elongation, Termination und das Recycling der Ribosomen unterschieden. Bereits für eine Vielzahl von Beispielen in verschiedensten Organismen wurde gezeigt, wie RNA-bindende Proteine an der Regulation der Translation beteiligt sind. Durch Interaktionen von an die Cap-Struktur der 5'UTR bindenden Initiationsfaktoren, mit weiteren an die 3'UTR oder den Poly-A Schwanz bindenden Proteinen, können die mRNA-Enden zu einem Ring verbunden werden [zusammengefasst von Sonenberg und Hinnebusch (2009)]. Diese Rückfaltung ermöglicht auch 3'UTR abhängige Mechanismen zur Translationskontrolle, die sowohl die Initiation als auch die Elongation der Translation betreffen können. Je nach Art der Zyklisierung kann die

Elongation hierbei begünstigt oder inhibiert werden (zusammengefasst in Mazumder et al. 2003). Wie bei den meisten Organismen, ist auch bei Trypanosomen die durchschnittliche Länge der 3'UTRs größer als die von 5'UTRs (Benz et al. 2005), was auf ein vergleichsweise größeres Potential bei der Genregulation hindeutet. Inwiefern sich generelle Beobachtungen zur Translationsregulation jedoch trotz der evolutionären Distanz direkt auf Trypanosomen übertragen lassen, ist unklar. Zelluläre Besonderheiten wie das *trans*-Spleißen, die Cap-Struktur aus 7-Methylguanosin und die abweichende 80 S Ribosomenarchitektur [zusammengefasst von Barry et al. (2007)] deuten zumindest darauf hin, dass Anpassungen der entsprechenden Mechanismen erforderlich sind.

Bei der Prozyklinregulation können die Effekte auf mRNA oder Translation auf Ebene der 3'UTR Elemente nicht getrennt werden. Für die einzelnen Mutationen sind die Verhältnisse der Regulation auf mRNA- bzw. Proteinebene variabel. Wobei die Unterschiede nach Kälteschockinduktion geringer sind, als bei der Entwicklungsregulation. Möglicherweise ist die Variabilität hier auch deshalb höher, weil aufgrund der technisch einfacheren Durchführung für die beiden Entwicklungsstadien zwei verschiedene Trypanosomenstämme (MITat 1.2 BSF bzw. AnTat 1.1 PCF) untersucht wurden.

### 4.3 Globaler Ansatz zur Kälteschockregulation

Parallel zu der systematischen Mutationsanalyse der kälteschocksensitiven Prozyklin 3'UTR zur Identifikation regulatorischer *cis*-Elemente, wurde in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von C. Clayton und J. Hoheisel (ZMBH bzw. DKFZ Heidelberg) mit Microarrays auch ein genomweiter Ansatz zur Identifikation von Unterschieden in den Expressionsprofilen nach Kälteschock verfolgt. Die Analyse der Microarraydaten zeigte erwartungsgemäß die Induktion der Prozyklintranskripte, die als Positivkontrollen dienten. Insgesamt wurden etwa 300 differenziell exprimierte Transkripte identifiziert, die größtenteils schwache, aber signifikante Veränderungen zeigen. Möglicherweise trägt auch die unspezifische Induktion durch das Ansteigen von mRNA-Halbwertszeiten bei verringerter Inkubationstemperatur, zumindest teilweise zu der beobachteten Breite der Häufigkeitsverteilung der Induktionsfaktoren in der Microarrayanalyse bei. Das für die Prozyklinexpression gezeigte Temperaturoptimum bei 20 °C (Engstler und Boshart 2004) suggeriert einen spezifischen Effekt. Inwiefern sich dieser mechanistisch von der generellen Induktion unterscheiden lässt, ist unklar. Man könnte spekulieren, dass sich die Induktion des Prozyklings nach Kälteschock im Vergleich zur generellen Induktion lediglich aufgrund von evolutionärer Selektion stärker auswirkt.

Durch die Mutationsanalyse der *EP1* 3'UTR wurde zunehmend deutlich, dass neben der Nukleotidsequenz auch die Sekundärstruktur einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Expression haben kann. Dies erschwert die Identifikation möglicher regulatorischer Konsensuselemente durch Vergleich von kälteschockinduzierten Sequenzen. Zusätzlich gestaltete

sich die geplante Gegenüberstellung mit kälteschocksensitiven *cis*-Elementen aus der *EP1* 3'UTR, aufgrund der im Laufe dieser Arbeit festgestellten Komplexität der Regulation mit mehreren redundanten und stadienspezifisch interagierenden *cis*-Elementen, als unrealistisches Ziel und wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

Citrat induziert nur extrazellulär verabreicht die Differenzierung von *T. brucei* BSF zu PCF (Fast 2000). Die Expression eines invarianten Citratrezeptors an der Zelloberfläche von BSF würde zur Erkennung des Parasiten durch das Immunsystem des Säugerwirtes führen. Aufgrund der erhöhten Sensitivität gegenüber Citrat und *cis*-Aconitat nach Kälteschock (Engstler und Boshart 2004) wurde eine Hypothese aufgestellt, nach welcher der postulierte Citratrezeptor ebenfalls durch Kälteschock induziert- oder an die Zelloberfläche transportiert wird. In den Annotierungen der durch die Microarrays identifizierten, induzierten Sequenzen, konnte jedoch kein direkter Hinweis auf ein entsprechendes Protein gefunden werden.

Die Beteiligung der in der Microarrayanalyse induzierten Gene an der Differenzierung bzw. der Erkennung von Citrat/*cis*-Aconitat, sollte als Teilprojekt einer anderen Doktorarbeit, im Rahmen einer RNAi-Rasteranalyse auch funktionell untersucht werden. Zwischenzeitlich wurde der postulierte Citratrezeptor von einer schottischen Arbeitsgruppe auf anderem Wege identifiziert (Dean et al. 2009). Es handelt sich um eine kleine Familie von Carboxylat-Transportern [Proteins, associated with differentiation (PAD) 1-8] auf der Oberfläche von stumpy BSF. Zumindest ein Vertreter dieser Familie (PAD2) zeigt nach Kälteschock eine Induktion der Proteinexpression. Auf mRNA-Ebene wurde jedoch keine Kälteschockinduktion festgestellt. Dies erklärt, warum das Transkript mit der in dieser Arbeit verfolgten Strategie nicht erkannt werden konnte.

Um mögliche Zusammenhänge der durch Kälteschock bzw. Entwicklung von BSF zu PCF induzierten Expressionsänderungen zu identifizieren, wurde die Schnittmenge mit einer technisch vergleichbaren Microarrayanalyse (Diehl et al. 2002) gebildet, in der etwa 2% der detektierbaren Transkripte differenzielle Regulationen zwischen BSF und PCF zeigten. Aktuellere Arbeiten können aufgrund der durch die Weiterentwicklung der Methode gestiegenen Sensitivität, mittlerweile mehr regulierte Transkripte identifizieren und gehen von über 10% differenziell exprimierter Gene aus (Kabani et al. 2009; Queiroz et al. 2009). Die Anzahl der sowohl nach Kälteschockinduktion (diese Arbeit), als auch nach Differenzierung zu PCF (Diehl et al. 2002) differenziell regulierten Gene ist verhältnismäßig klein (Tab. 6). Die Coinduktion dieser Transkripte kann verschiedene Ursachen haben: i) Coinduktion aufgrund eines biologischen Zusammenhanges, ii) generelle Induktion durch Stressbedingungen oder iii) zufällige Coinduktion. Anhand der Genannotierungen konnten durch Datenbankanalyse innerhalb der Schnittmenge keine direkten Hinweise für generelle Stressproteine gefunden werden. Auch die sehr geringe Überschneidung der Kälteschockregulation mit den nach

Dipyridamol-Stress induzierten Sequenzen (nur zwei der jeweils 100 am stärksten regulierten Transkripte) spricht gegen eine generelle Stressantwort. Möglicherweise sind die Änderungen nach Kälteschock z. T. auch nur transient. Die im Vergleich zu den beiden früheren Zeitpunkten deutlich verringerte Anzahl an regulierten Sequenzen nach Kälteschockinduktion für 16 h [siehe Abb. 33 (A)] deutet jedenfalls darauf hin.

Am Beispiel der Prozyklinexpression wurde in dieser Arbeit für die Regulation auf mRNA-Ebene nur ein verhältnismäßig geringer Anteil an der Gesamtregulation nach Kälteschock festgestellt. Die Regulation der Translation scheint die wichtigere Rolle zu spielen. Dennoch lieferte auch die Microarrayanalyse von polysomenassoziiierter RNA keine deutlicheren Induktionssignale. Die Bindung von mRNA an die Ribosomen, die hierbei ebenfalls berücksichtigt wird, scheint somit keinen bedeutenden Anteil an der Kälteschockinduktion auszumachen. Änderungen der Translations-Elongation können durch diese Methode jedoch nicht erfasst werden. Möglicherweise wirkt ein größerer Teil der Regulation auch auf dieser Ebene, z. B. über die Beeinflussung der mRNA-Zyklisierung durch regulatorische *cis*-Elemente in der 3'UTR (siehe oben).

#### 4.4 *Trans*-Faktoren der Kälteschockregulation?

Trotz der großen Zahl konservierter putativer RNA-Bindeproteine in den Genomen der verwandten Pathogene *T. brucei*, *T. cruzi* und *Leishmania major*, konnten bislang nur wenige RNA-bindende *trans*-Regulatoren charakterisiert werden [zusammengefasst von Haile und Papadopoulou (2007)]. Die Prozyklingene zählen zu den am besten untersuchten Sequenzen im Genom von *T. brucei*. Dennoch ist lediglich ein Protein bekannt, das mit Prozyklintranskripten co-assoziiert. Ob ZFP3 direkt an das Prozyklin Transkript binden kann oder nur Teil eines Komplexes ist, bei dem andere Proteine für die Bindung an die mRNA verantwortlich sind, ist unklar. Durch Immunpräzipitationen wurde gezeigt, dass die Assoziation an die 3'UTRs der *EP1* und *GPEET* Prozyklone erfolgt, und zudem von den regulatorischen Elementen Loop II und 16mer abhängt (Walrad et al. 2009). Ein stadienspezifisch regulierter Zusammenhang zwischen diesen beiden *cis*-Elementen wurde in dieser Arbeit (siehe 3.2.11.7) eindeutig gezeigt. Die Überexpression von ZFP3 führt bei der Differenzierung von BSF zu PCF zur verstärkten EP Expression. Es wurde daher vermutet, dass ZFP3 ein *trans*-Faktor für die differenzielle Regulation der Prozyklinexpression ist (Paterou et al. 2006; Walrad et al. 2009).

Eine mögliche Beteiligung an der Kälteschockregulation wurde nun in dieser Arbeit untersucht. Durch quantitative Analyse von Western-Blots wurde zunächst gezeigt, dass die Expression von ZFP3 nicht selbst durch Kälteschock (16 h 20 °C) reguliert wird [siehe Abb. 37 (C)]. Paterou et al. (2006) beobachteten nach Induktion von RNAi gegen ZFP3 lediglich eine geringe Reduktion des Proteins (60% der uninduzierten Kontrolle), was weitere Untersuchungen wenig schlüssig machte. In dieser Arbeit gelang es nun durch ein Haarnadel RNAi-Konstrukt, die ZFP3-Expression nach Induktion von RNAi auf weniger als 5% der uninduzierten Kontrolle zu reduzieren [siehe Abb. 37 (D)].

Die unterschiedlichen Effizienzen der RNAi-Experimente können möglicherweise durch die verwendeten Kulturmethoden, RNAi Zielsequenzen oder -Vektoren erklärt werden. Die deutliche Reduktion der ZFP3 Expression hatte in dieser Arbeit keine signifikanten Änderungen der Luciferaseexpression bei 37 °C oder nach Kälteschockinduktion zur Folge [siehe Abb. 37 (F)]. Eine notwendige Beteiligung von ZFP3 an der Kälteschockregulation von Prozyklin, sowie ein Effekt von ZFP3 auf die basale Reporterexpression in BSF bei 37 °C sind demzufolge unwahrscheinlich.

Unabhängig davon spricht auch die beobachtete Kälteschockinduktion verschiedener Zelllinien mit gleichzeitiger Mutation beider für die Immunpräzipitation nötiger 3'UTR-Elemente (Konstrukte  $\Delta$ LII inv 208-217 und  $\Delta$ LII+III, siehe Abb. 23) gegen eine essenzielle Beteiligung von ZFP3 an der Kälteschockregulation.

Aus der durchgeführten Mutationsanalyse der *EP1* 3'UTR resultieren weitere interessante Kandidaten für Co-Immunpräzipitationsexperimente, analog zu der Beschreibung von Walrad et al. (2009). So könnte die Untersuchung der  $\Delta$ LIV Mutante zeigen, ob auch bezüglich der Bindung von ZFP3 ein Zusammenhang zwischen den negativen Elementen in Loop II und Loop IV besteht. Außerdem könnte die in dieser Arbeit entworfene, strukturkonservative Inversionsmutante des 16mers (Konstrukt inv 208-217) eindeutig zeigen, inwiefern die nach Deletion des 16mers beobachtete Verhinderung der Co-Immunpräzipitation, tatsächlich auf dieses Element zurückzuführen ist oder ob vielmehr durch die verwendete 16mer Deletionsmutante Sekundärstruktur-Veränderungen in anderen 3'UTR-Bereichen hervorgerufen wurden, die indirekt die beobachteten Effekte verursachen.

Neben ZFP3 wurden fünf weitere Kandidatenproteine auf ihre Beteiligung an der Kälteschockregulation untersucht. Die in diesem Labor bereits umfassend charakterisierte PKA-ähnliche Kinase erschien als interessanter Kandidat, weil ihre Aktivität (gemessen über die Phosphorylierung des heterolog exprimierten, PKA-spezifischen Reportersubstrates VASP) ebenfalls durch Kälteschock induzierbar ist (Kramer 2004). Dieser Effekt ist, wie auch die Induktion von Prozyklin, spezifisch für BSF (Pepperl 2007; Bachmaier 2008). Durch Nullmutation der regulatorischen Untereinheit geht diese Induzierbarkeit durch Kälteschock verloren (Bachmaier 2008). Des Weiteren zeigen BSF mit  $\Delta$ *pkar*/ $\Delta$ *pkar* Nullmutation nur eine eingeschränkte Fähigkeit zur Differenzierung (Pepperl 2007). Die Analyse von  $\Delta$ *pkar*/ $\Delta$ *pkar* Zelllinien mit dem Luciferase Reporter unter Kontrolle der *EP1* 3'UTR zeigte im Vergleich zu entsprechenden Reporterzelllinien mit WT Hintergrund keinen Unterschied in der Kälteschockinduktion der Luciferaseexpression [siehe Abb. 36 (B)]. Die Regulationen von Prozyklinexpression und PKA-Aktivität werden somit zwar vom gleichen Stimulus beeinflusst, die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen jedoch, dass die PKA-ähnliche Kinase für die Kälteschockinduktion von Prozyklin nicht erforderlich ist (siehe Abb. 44).

Aufgrund der auffallenden Homologie zu dem Konsensusmotiv RNA-bindender CSD-Proteine in der *EP1* 3'UTR (nt 181-193; Engstler und Boshart, unpublizierte Daten) wurde in den Genomsequenzen der verwandten Pathogene *T. brucei*, *T. cruzi* und *Leishmania major* nach Proteinen mit entsprechender Sequenz gesucht. Neben dem RNA-bindenden Protein (RBP16) mit annotierter CSD-Domäne, wurden in dieser Arbeit durch HMMER Profilsuchen in *T. brucei* zwei weitere konservierte hypothetische Proteine mit CSD-Domäne identifiziert (siehe Tab. 9). Das Herabregulieren der entsprechenden Proteine lieferte jedoch keine Hinweise für eine Beteiligung dieser Proteine an der Kälteschockregulation von Prozyklin (siehe Abb. 38). Die möglicherweise auch nach Induktion des RNAi verbleibende Proteinmenge konnte jedoch mangels Antikörper nicht überprüft werden. Da sich durch die Mutationsanalyse der Prozyklin 3'UTR im Verlauf dieser Arbeit herausstellte, dass der Sequenzbereich mit Homologie zu der Bindestelle für CSD-Proteine nicht für den Kälteschockeffekt benötigt wird (siehe 3.2.11.5), wurden die Kandidatenproteine mit entsprechender CSD-Domäne nicht weiter analysiert.

Aktuelle Arbeiten zeigen, dass multiple kleine RNAs in den verschiedensten Organismen eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation spielen können [zusammengefasst von Carthew und Sontheimer (2009)]. In Trypanosomen macht die posttranskriptionelle Regulation den überwiegenden Teil der Regulation aus. Im Gegensatz zu Hefe oder zahlreichen anderen Protozoen besitzt *T. brucei* einen funktionellen endogenen RNAi-Mechanismus. Dessen *in vivo*-Funktion ist trotz intensiver Suche jedoch bislang unbekannt. Möglicherweise dient RNAi der Abwehr gegen Transposons [zusammengefasst von Ullu et al. (2004)]. Da der nahe verwandte Parasit *T. cruzi* keine funktionelle RNAi-Maschinerie besitzt, ist die Beteiligung von RNAi an fundamentalen Mechanismen der Genregulation unwahrscheinlich. Das AGO1 Protein ist eine essenzielle Komponente der RNAi-Maschinerie in *T. brucei* (Durand-Dubief und Bastin 2003). Es gibt im Genom nur ein AGO1 Homolog. Durch Vergleich der Expressionen von BSF Zelllinien mit dem Luciferase Reporter unter Kontrolle der *EP1* 3'UTR mit WT- oder  $\Delta ago1/\Delta ago1$  Hintergrund (siehe Tab. 8) wurde gezeigt, dass die Kälteschockinduktion von Prozyklin unabhängig vom endogenen RNAi-Mechanismus ist.

#### 4.5 Identifikation potentieller Signalproteine

Ergänzend zu der Bottom-up Analyse der Kälteschockregulation am Beispiel der Prozyklin 3'UTR bzw. genomweit mittels Microarrays, wurde eine Methode zur Darstellung von Proteinphosphorylierungen in *T. brucei* etabliert, um die Identifikation von Komponenten des Kälteschock-Signalweges in einem Top-down Versuchsansatz zu ermöglichen (siehe Abb. 39). Durch radioaktive *in vivo* Markierung von Trypanosomen mit  $^{32}\text{P}$  (Orthophosphat) nach verschiedenen Stimuli, anschließende Auftrennung der (präfraktionierten) Proteinextrakte durch großformatige zweidimensionale Gelelektrophorese und Gegenüberstellung der entsprechenden Autoradiogramme sollen differenzielle Proteinphosphorylierungen visualisiert werden, um am Kälteschockmechanismus





Die gezeigten Veränderungen können entweder direkt auf die Nullmutation der *pkar* zurückzuführen sein, oder aber aus Gegenregulationsmechanismen resultieren, welche die Nullmutation kompensieren. Die Tatsache, dass es nach Nullmutation der *pkar* nicht zu einem letalen Phänotyp kommt, spricht für eine Gegenregulation bereits während der Selektion von Transfektanten.

Die Detektion von nach Induktion mit verschiedenen Stimuli variablen Proteinphosphorylierungen ist auf die gleiche Weise möglich, erfordert jedoch zusätzlich die Identifikation der jeweils am besten geeigneten Induktionszeiten. Transiente Proteinphosphorylierungen erschweren dies möglicherweise. Am Beispiel der kälteschockinduzierbaren PKA-ähnlichen Kinase wurde durch Western-Blot und Immundetektion mit Hilfe eines phosphorylierungsspezifischen Antikörpers bereits nach 5-15 –minütiger Inkubation bei 4 °C die maximale Phosphorylierung des heterolog exprimierten, PKA-spezifischen Reportersubstrates VASP beobachtet (Bachmaier 2008). Für die differenzielle Analyse von Proteinphosphorylierungen nach Kälteschockinduktion in WT BSF wurden demzufolge, soweit dies die technische Ausstattung im Isotopenlabor zuließ, vergleichbare Induktionsbedingungen gewählt. Nach Induktionen für 2,5-10 min bei 6 °C wurden jedoch keine Unterschiede im Phosphorylierungsmuster festgestellt.

Die stets auftretende Ähnlichkeit der erhaltenen Autoradiogramme, verdeutlicht dennoch die Reproduzierbarkeit der Methode. Neben der Dauer der Kälteschockinduktion spielt auch die Dauer der Inkubation mit  $^{32}\text{P}$  eine große Rolle. Kürzere Markierungszeiten visualisieren die frühesten Ereignisse, während die Zahl der detektierten Proteine nach längerer Markierung zunimmt. Gleichzeitig überlagern jedoch nach längerer Markierungsdauer unter Umständen stärkere konstitutive Signale die schwächeren differenziellen Proteinphosphorylierungen. Weitere Zeitverlauf-Experimente sind erforderlich, um das optimale Zeitfenster zu bestimmen. Möglicherweise kann die Sensitivität zusätzlich durch die Anreicherung von Phosphoproteinen, Präfraktionierung und Verwendung engerer pH-Gradienten bei der isoelektrischen Fokussierung erhöht werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Optimierung dieser Schritte nicht mehr durchgeführt werden.

Eine mögliche Erklärung für die geringe Anzahl differenzieller Proteinphosphorylierungen kann auch die generelle Markierung aller Phosphorylierungsstellen durch diese Methode sein. So könnten z. B. Proteine mit drei  $^{32}\text{P}$ -Phosphorylierungen nach Kälteschock eine zusätzliche vierte radioaktive Markierung erhalten. Der Intensitätsunterschied im Autoradiogramm wäre demnach nicht 0:1, sondern 3:4. Zusätzlich sind Proteinphosphorylierungen in einer Zelle oder innerhalb einer Kultur häufig nicht von 0% auf 100% induzierbar. So steigt beispielsweise der Anteil des durch die PKA-ähnliche Kinase phosphorylierten VASP Reporterproteins nach Kälteschock von 20% (basale Phosphorylierung) auf maximal 65% an (Bachmaier 2008). Dementsprechend würde sich das Verhältnis im Autoradiogramm entsprechend verringern. Im Vergleich dazu, wird bei der Immundetektion durch spezifische Antikörper gegen eine definierte Phosphorylierungsstelle jedoch

ausschließlich das phosphorylierte Motiv erkannt. Das Verhältnis im Western-Blot ist demzufolge immer 0:1. Da für die Identifikation unbekannter Phosphoproteine, die an der Kälteschockinduktion oder Differenzierung beteiligt sind dieser Ansatz nicht möglich ist, ist die generelle Markierung sämtlicher Phosphoproteine durch  $^{32}\text{P}$  (Orthophosphat) dennoch die Methode der Wahl.

Die radioaktive Markierung von stumpy-ähnlichen BSF, die im Zellzyklus arretiert- und auf die Differenzierung vorbereitet sind, war mit der beschriebenen Methode ebenfalls erfolgreich [siehe Tab. 10 (C)]. Hierfür wurden monomorphe MITat 1.4 BSF Zelllinien verwendet, die in Kultur bei hoher Zelldichte effizient stumpy-ähnliche BSF bilden. Die Änderungen der Proteinphosphorylierungen nach Kälteschock können so mit denen der beginnenden Differenzierung von BSF zu PCF verglichen werden. Die Induktion der Differenzierung kann hierfür durch das Standard *in vitro*-Protokoll (27 °C, 6 M Citrat/*cis*-Aconitat) (Brun und Schonenberger 1981; Czichos et al. 1986), unterstützt durch Kälteschock (20 °C, 6 mM Citrat/*cis*-Aconitat) (Engstler und Boshart 2004) oder durch RNAi gegen, bzw. durch chemische Inhibierung von PTP1B (Sזור et al. 2006) induziert werden. Zusätzlich können die Effekte weiterer (möglicherweise) am Differenzierungsprozess beteiligter Proteine wie PAD1 (Dean et al. 2009) oder KID1 (Kinase involved in differentiation, M. Kador dieses Labor, unpublizierte Daten) untersucht werden. Die Analyse zusätzlicher, an der Differenzierung beteiligter Signalproteine, die im Rahmen einer komplementär zu diesem Projekt initiierten RNAi-Rasteranalyse sämtlicher Kinasen von *T. brucei* (Nett et al. 2009) identifiziert werden (M. Kador dieses Labor, unpublizierte Daten), ist ebenfalls geplant.

Durch die Gegenüberstellung entsprechender Proteinphosphorylierungsmuster (auch nach kombinierter Induktion mit verschiedenen Stimuli) kann diese Methode bei der Klärung folgender Fragen helfen: i) Rufen die verschiedenen Induktionen Änderungen am Phosphorylierungsmuster hervor? ii) Wenn ja, wie viele Änderungen können detektiert werden? iii) Können zwischen den verschiedenen Stimuli allgemeine von spezifischen Veränderungen unterschieden werden? iv) Ist eine zeitliche Abfolge der Änderungen erkennbar? v) Welche Zeitpunkte zeigen die signifikantesten Veränderungen?

Auch nach Präfraktionierung der Zellextrakte und Eingrenzung der pH-Bereiche durch Zoom-Gele, ist die Identifikation von Proteinen durch Massenspektrometrie jedoch unter Umständen aufgrund der häufig geringen Abundanz von Signalproteinen und der möglicherweise auftretenden Überlagerung mehrerer Proteine im Gel schwierig. Die Identifikation von Konditionen mit signifikanten Expressionsunterschieden durch kontrollierte Markierungsexperimente ermöglicht jedoch anschließend proteomweite Experimente mit der quantitativen iTRAQ Methode, durch die dann gleichzeitig auch die Sequenzen der Kandidatenproteine identifiziert werden können. Nur nach vorheriger Kontrolle der dafür geeigneten Bedingungen sind entsprechende Experimente lohnend.

## 5 Literaturverzeichnis

### 5.1 Bücher

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Weidman, J.G., Smith, J.A., and Strul, K. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital (USA).
- Barry, D., McCulloch, R., Mottram, J. and Acosta-Serrano, A. 2007. *Trypanosomes After the Genome*. Horizon Bioscience, Norfolk (UK).
- Görg, A., Fanous, A., Harder, A., Weiland, F., Westermeier, R. and Weiss, W. 2007. *Two Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteine Analysis*, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan.
- Lucius, R., Loos-Frank, B. 1997. *Parasitologie - Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner*. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Rehm, H. 2006. *Der Experimentator Proteinbiochemie / Proteomics*. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Rice, J.A. 2006. *Mathamatical Statistics and Data Analysis*. Third International Student Edition, Thomson Brooks Cole, Belmont, California (USA), Chapter 4.6: Approximative Methods.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (USA).
- Westermeier, R. 1997. *Electrophoresis in Practice*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Westermeier, R., Naven, T. and Höpker, H.-R. 2008. *Proteomics in Practice*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

### 5.2 Artikel

- Acosta-Serrano, A., Cole, R.N., Mehlert, A., Lee, M.G., Ferguson, M.A., and Englund, P.T. 1999. The procyclin repertoire of *Trypanosoma brucei*. Identification and structural characterization of the Glu-Pro-rich polypeptides. *J Biol Chem* 274(42): 29763-29771.
- Acosta-Serrano, A., Vassella, E., Liniger, M., Kunz Renggli, C., Brun, R., Roditi, I., and Englund, P.T. 2001. The surface coat of procyclic *Trypanosoma brucei*: programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin in the tsetse fly. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(4): 1513-1518.
- Agbo, E.C., Clausen, P.H., Buscher, P., Majiwa, P.A., Claassen, E., and te Pas, M.F. 2003. Population genetic structure and cladistic analysis of *Trypanosoma brucei* isolates. *Infect Genet Evol* 3(3): 165-174.
- Akopyants, N.S., Matlib, R.S., Bukanova, E.N., Smeds, M.R., Brownstein, B.H., Stormo, G.D., and Beverley, S.M. 2004. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 136(1): 71-86.
- Aksoy, S., Gibson, W.C., and Lehane, M.J. 2003. Interactions between tsetse and trypanosomes with implications for the control of trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 53: 1-83.

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3): 403-410.
- Amiguet-Vercher, A., Perez-Morga, D., Pays, A., Poelvoorde, P., Van Xong, H., Tebabi, P., Vanhamme, L., and Pays, E. 2004. Loss of the mono-allelic control of the VSG expression sites during the development of *Trypanosoma brucei* in the bloodstream. *Mol Microbiol* 51(6): 1577-1588.
- Bachmaier, S. 2008. Charakterisierung einer PKA-ähnlichen Kinase in *Trypanosoma brucei*. *Diplomarbeit*: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Barreau, C., Paillard, L., and Osborne, H.B. 2005. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* 33(22): 7138-7150.
- Bayne, R.A.L., Kilbride, E.A., Lainson, F.A., Tetley, L., and Barry, J.D. 1993. A major surface antigen of procyclic stage *Trypanosoma congolense*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 61(N2): 295-310.
- Ben Amar, M.F., Pays, A., Tebabi, P., Dero, B., Seebeck, T., Steinert, M., and Pays, E. 1988. Structure and transcription of the actin gene of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 8(5): 2166-2176.
- Benz, C., Nilsson, D., Andersson, B., Clayton, C., and Guillebride, D.L. 2005. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 143(2): 125-134.
- Berberof, M., Vanhamme, L., Tebabi, P., Pays, A., Jefferies, D., Welburn, S., and Pays, E. 1995. The 3'-terminal region of the mRNAs for VSG and procyclin can confer stage specificity to gene expression in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 14(12): 2925-2934.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B. et al. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309(5733): 416-422.
- Biebinger, S., Rettenmaier, S., Flaspohler, J., Hartmann, C., Pena-Diaz, J., Wirtz, L.E., Hotz, H.R., Barry, J.D., and Clayton, C. 1996. The *PARP* promoter of *Trypanosoma brucei* is developmentally regulated in a chromosomal context. *Nucleic Acids Res* 24(7): 1202-1211.
- Biebinger, S., Wirtz, L.E., Lorenz, P., and Clayton, C. 1997. Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 85(1): 99-112.
- Birnboim, H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100: 243-255.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.
- Boucher, N., Wu, Y., Dumas, C., Dube, M., Sereno, D., Breton, M., and Papadopolou, B. 2002. A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem* 277(22): 19511-19520.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brems, S. 2006. Entwicklung eines DNA-Arrays zur Analyse der differentiellen Genexpression in *Trypanosoma brucei*. *Dissertation*: Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

- Brems, S., Guilbride, D.L., Gundlesdodjir-Planck, D., Busold, C., Luu, V.D., Schanne, M., Hoheisel, J., and Clayton, C. 2005. The transcriptomes of *Trypanosoma brucei* Lister 427 and TREU927 bloodstream and procyclic trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 139(2): 163-172.
- Brenndörfer, M. 2003. Kälteschockregulation des *EP1* Prozyklin-Gens von *Trypanosoma brucei*. *Diplomarbeit*: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Brenndörfer, M. and Boshart, M. 2010. Selection of reference genes for mRNA quantification in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 172(1):52-55.
- Bringaud, F., Riviere, L., and Coustou, V. 2006. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* 149(1): 1-9.
- Bronstein, I., Fortin, J., Stanley, P.E., Stewart, G.S., and Kricka, L.J. 1994. Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Anal Biochem* 219(2): 169-181.
- Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., and Burri, C. 2009. Human African trypanosomiasis. *Lancet* 375(9709): 148-159.
- Brun, R., Jenni, L., Schönenberger, M., and Schell, K.-F. 1981. *In vitro* cultivation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense*, and *T. gambiense*. *Journal of Protozoology* 28(N4): 470-479.
- Brun, R. and Schonenberger, M. 1979. Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. *Acta Trop* 36(3): 289-292.
- Brun, R. and Schonenberger, M. 1981. Stimulating effect of citrate and *cis*-Aconitate on the transformation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms to procyclic forms *in vitro*. *Z Parasitenkd* 66(1): 17-24.
- Burkard, G., Fragoso, C.M., and Roditi, I. 2007. Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 153(2): 220-223.
- Carrington, M., Roditi, I., and Williams, R.O. 1987. The structure and transcription of an element interspersed between tandem arrays of mini-exon donor RNA genes in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research* 15(N24): 10179-10198.
- Carruthers, V.B., van der Ploeg, L.H., and Cross, G.A. 1993. DNA-mediated transformation of bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 21(10): 2537-2538.
- Carthew, R.W. and Sontheimer, E.J. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136(4): 642-655.
- Chevallet, M., Luche, S., and Rabilloud, T. 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc* 1(4): 1852-1858.
- Clayton, C. 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 21(8): 1881-1888.
- Clayton, C., Adams, M., Almeida, R., Baltz, T., Barrett, M., Bastien, P., Belli, S., Beverley, S., Biteau, N., Blackwell, J. et al. 1998. Genetic nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 97(1-2): 221-224.

- Clayton, C. and Hotz, H.R. 1996. Post-transcriptional control of *PARP* gene expression. *Mol Biochem Parasitol* 77(1): 1-6.
- Clayton, C. and Shapira, M. 2007. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* 156(2): 93-101.
- Clayton, C. 1988. The molecular biology of the Kinetoplastidae. *Genet Eng* 7: 1-56.
- Cohen, P. 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation - a 25 year update. *Trends Biochem Sci* 25(12): 596-601.
- Colasante, C., Robles, A., Li, C.H., Schwede, A., Benz, C., Voncken, F., Guilbride, D.L., and Clayton, C. 2007. Regulated expression of glycosomal phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 151(2): 193-204.
- Cross, G.A. 1975. Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* 71(3): 393-417.
- Cross, G.A. and Manning, J.C. 1973. Cultivation of *Trypanosoma brucei* spp. in semi-defined and defined media. *Parasitology* 67(3): 315-331.
- Czichos, J., Nonnengaesser, C., and Overath, P. 1986. *Trypanosoma brucei*: cis-aconitate and temperature reduction as triggers of synchronous transformation of bloodstream to procyclic trypomastigotes in vitro. *Experimental Parasitology* 62(N2): 283-291.
- Dean, S., Marchetti, R., Kirk, K., and Matthews, K.R. 2009. A surface transporter family conveys the trypanosome differentiation signal. *Nature* 459(7244): 213-217.
- Delauw, M.F., Pays, E., Steinert, M., Aerts, D., Van Meirvenne, N., and Le Ray, D. 1985. Inactivation and reactivation of a variant-specific antigen gene in cyclically transmitted *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 4(4): 989-993.
- Diehl, S., Diehl, F., El-Sayed, N.M., Clayton, C., and Hoheisel, J.D. 2002. Analysis of stage-specific gene expression in the bloodstream and the procyclic form of *Trypanosoma brucei* using a genomic DNA-microarray. *Mol Biochem Parasitol* 123(2): 115-123.
- Dorn, P.L., Aman, R.A., and Boothroyd, J.C. 1991. Inhibition of protein synthesis results in super-induction of procyclin (*PARP*) RNA levels. *Mol Biochem Parasitol* 44(1): 133-139.
- Dreesen, O., Li, B., and Cross, G.A. 2005. Telomere structure and shortening in telomerase-deficient *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 33(14): 4536-4543.
- Drozd, M. and Clayton, C. 1999. Structure of a regulatory 3' untranslated region from *Trypanosoma brucei*. *RNA* 5(12): 1632-1644.
- Durand-Dubief, M. and Bastin, P. 2003. TbAGO1, an argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in *Trypanosoma brucei*. *BMC Biol* 1: 2.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Petrosino, J.F., Qin, X., Muzny, D.M., Ayele, M. et al. 2008. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol* 190(7): 2597-2606.
- Eddy, S.R. 1998. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 14(9): 755-763.

- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G. et al. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309(5733): 409-415.
- Engstler, M. and Boshart, M. 2004. Cold shock and regulation of surface protein trafficking convey sensitization to inducers of stage differentiation in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev* 18(22): 2798-2811.
- Engstler, M., Pfohl, T., Herminghaus, S., Boshart, M., Wiegertjes, G., Heddergott, N., and Overath, P. 2007. Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell* 131(3): 505-515.
- Fast, B. 2000. Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Funktion einer cytoplasmatisch lokalisierten Aconitase im Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei*. *Dissertation*: Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132(1): 6-13.
- Fellenberg, K., Hauser, N.C., Brors, B., Hoheisel, J.D., and Vingron, M. 2002. Microarray data warehouse allowing for inclusion of experiment annotations in statistical analysis. *Bioinformatics* 18(3): 423-433.
- Ferguson, M.A. 1999. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci* 112(Pt 17): 2799-2809.
- Ferguson, M.A., Duszenko, M., Lamont, G.S., Overath, P., and Cross, G.A. 1986. Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. N-glycosylation and addition of a phosphatidylinositol membrane anchor. *J Biol Chem* 261(1): 356-362.
- Finn, R.D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P.C., Sammut, S.J., Hotz, H.R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L. et al. 2008. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 36(Database issue): D281-288.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806-811.
- Furger, A., Schurch, N., Kurath, U., and Roditi, I. 1997. Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation. *Mol Cell Biol* 17(8): 4372-4380.
- Gabrielsson, B.G., Olofsson, L.E., Sjogren, A., Jernas, M., Elander, A., Lonn, M., Rudemo, M., and Carlsson, L.M. 2005. Evaluation of reference genes for studies of gene expression in human adipose tissue. *Obes Res* 13(4): 649-652.
- Gadelha, C., LeBowitz, J.H., Manning, J., Seebeck, T., and Gull, K. 2004. Relationships between the major kinetoplastid paraflagellar rod proteins: a consolidating nomenclature. *Mol Biochem Parasitol* 136(1): 113-115.
- Galiveti, C.R., Rozhdestvensky, T.S., Brosius, J., Lehrach, H., and Konthur, Z. 2009. Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR. *RNA* 16(2): 450-461.
- Geigy, R., Jenni, L., Kauffmann, M., Onyango, R.J., and Weiss, N. 1975. Identification of *T. brucei*-subgroup strains isolated from game. *Acta Trop* 32(3): 190-205.

- Gibson, W., Peacock, L., Ferris, V., Williams, K., and Bailey, M. 2008. The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. *Parasit Vectors* 1(1): 4.
- Gillinger, G. and Bellofatto, V. 2001. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res* 29(7): 1556-1564.
- Gorman, C.M., Moffat, L.F., and Howard, B.H. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2(9): 1044-1051.
- Gould, S.J. and Subramani, S. 1988. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal Biochem* 175(1): 5-13.
- Graham, S.V. and Barry, J.D. 1996. Polysomal, procyclin mRNAs accumulate in bloodstream forms of monomorphic and pleomorphic trypanosomes treated with protein synthesis inhibitors. *Mol Biochem Parasitol* 80(2): 179-191.
- Haenni, S., Renggli, C.K., Fragosio, C.M., Oberle, M., and Roditi, I. 2006. The procyclin-associated genes of *Trypanosoma brucei* are not essential for cyclical transmission by tsetse. *Mol Biochem Parasitol* 150(2): 144-156.
- Hahn, M. 2007. Stadienspezifische Regulation der Enzyme des Citratzyklus in *Trypanosome brucei*. *Diplomarbeit*: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Haile, S. and Papadopoulou, B. 2007. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 10(6): 569-577.
- Hayman, M.L. and Read, L.K. 1999. *Trypanosoma brucei* RBP16 is a mitochondrial Y-box family protein with guide RNA binding activity. *J Biol Chem* 274(17): 12067-12074.
- Hehl, A. and Roditi, I. 1994. The regulation of procyclin expression in *Trypanosoma brucei*: making or breaking the rules? *Parasitol Today* 10(11): 442-445.
- Hehl, A., Vassella, E., Braun, R., and Roditi, I. 1994. A conserved stem-loop structure in the 3' untranslated region of procyclin mRNAs regulates expression in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(1): 370-374.
- Heitmüller, A. 2007. Funktion der Histon-Methyltransferase DOT1B in der stadienspezifischen Genregulation in *Trypanosoma brucei*. *Diplomarbeit*: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Hendriks, E., van Deursen, F.J., Wilson, J., Sarkar, M., Timms, M., and Matthews, K.R. 2000. Life-cycle differentiation in *Trypanosoma brucei*: molecules and mutants. *Biochem Soc Trans* 28(5): 531-536.
- Hendriks, E.F. and Matthews, K.R. 2005. Disruption of the developmental programme of *Trypanosoma brucei* by genetic ablation of TbZFP1, a differentiation-enriched CCCH protein. *Mol Microbiol* 57(3): 706-716.
- Hendriks, E.F., Robinson, D.R., Hinkins, M., and Matthews, K.R. 2001. A novel CCCH protein which modulates differentiation of *Trypanosoma brucei* to its procyclic form. *EMBO J* 20(23): 6700-6711.
- Hertz-Fowler, C., Peacock, C.S., Wood, V., Aslett, M., Kerhornou, A., Mooney, P., Tivey, A., Berriman, M., Hall, N., Rutherford, K. et al. 2004. GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms. *Nucleic Acids Res* 32(Database issue): D339-343.



- Hirumi, H. and Hirumi, K. 1989. Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *J Parasitol* 75(6): 985-989.
- Hoogewijs, D., Houthoofd, K., Matthijssens, F., Vandesompele, J., and Vanfleteren, J.R. 2008. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC Mol Biol* 9: 9.
- Horrocks, D.I. 1978. A new method of quench monitoring in liquid scintillation counting: The H number concept. *Journal of Radioanalytical Chemistry* 43: 489-521.
- Hotz, H.R., Biebinger, S., Flaspohler, J., and Clayton, C. 1998. *PARP* gene expression: control at many levels. *Mol Biochem Parasitol* 91(1): 131-143.
- Hotz, H.R., Hartmann, C., Huober, K., Hug, M., and Clayton, C. 1997. Mechanisms of developmental regulation in *Trypanosoma brucei*: a polypyrimidine tract in the 3'-untranslated region of a surface protein mRNA affects RNA abundance and translation. *Nucleic Acids Res* 25(15): 3017-3026.
- Hotz, H.R., Lorenz, P., Fischer, R., Krieger, S., and Clayton, C. 1995. Role of 3'-untranslated regions in the regulation of hexose transporter mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 75(1): 1-14.
- Hug, M., Hotz, H.R., Hartmann, C., and Clayton, C. 1994. Hierarchies of RNA-processing signals in a trypanosome surface antigen mRNA precursor. *Mol Cell Biol* 14(11): 7428-7435.
- Irmer, H. and Clayton, C. 2001. Degradation of the unstable *EP1* mRNA in *Trypanosoma brucei* involves initial destruction of the 3'-untranslated region. *Nucleic Acids Res* 29(22): 4707-4715.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R. et al. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309(5733): 436-442.
- Janzen, C.J., van Deursen, F., Shi, H., Cross, G.A., Matthews, K.R., and Ullu, E. 2006. Expression site silencing and life-cycle progression appear normal in Argonaute1-deficient *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 149(1): 102-107.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. 1987. *GUS* fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6(13): 3901-3907.
- Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J., Di Padova, F., Lin, S.C., Gram, H., and Han, J. 2005. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120(5): 623-634.
- Jones, A., Faldas, A., Foucher, A., Hunt, E., Tait, A., Wastling, J.M., and Turner, C.M. 2006. Visualisation and analysis of proteomic data from the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *Proteomics* 6(1): 259-267.
- Jones, P.G. and Inouye, M. 1994. The cold-shock response - a hot topic. *Mol Microbiol* 11(5): 811-818.
- Kabani, S., Fenn, K., Ross, A., Ivens, A., Smith, T.K., Ghazal, P., and Matthews, K. 2009. Genome-wide expression profiling of *in vivo*-derived bloodstream parasite stages and dynamic analysis of mRNA alterations during synchronous differentiation in *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* 10: 427.

- Kinoshita, E., Takahashi, M., Takeda, H., Shiro, M., and Koike, T. 2004. Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) complex. *Dalton Trans*(8): 1189-1193.
- Klößner, T. 1996. cAMP-Signaltransduktion in *Trypanosoma brucei*: Klonierung und Charakterisierung von Proteinkinase A- und Phosphodiesterase-Homologen. *Dissertation*: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Kohl, L., Sherwin, T., and Gull, K. 1999. Assembly of the paraflagellar rod and the flagellum attachment zone complex during the *Trypanosoma brucei* cell cycle. *J Eukaryot Microbiol* 46(2): 105-109.
- König, E., Delius, H., Carrington, M., Williams, R.O., and Roditi, I. 1989. Duplication and transcription of procyclin genes in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 17(21): 8727-8739.
- Koumandou, V.L., Natesan, S.K., Sergeenko, T., and Field, M.C. 2008. The trypanosome transcriptome is remodelled during differentiation but displays limited responsiveness within life stages. *BMC Genomics* 9: 298.
- Kramer, S. 2004. Charakterization of a PKA-like kinase from *Trypanosoma brucei*. *Dissertation*: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Kunz, S., Klößner, T., Essen, L.O., Seebeck, T., and Boshart, M. 2004. TbPDE1, a novel class I phosphodiesterase of *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* 271(3): 637-647.
- Kyhse-Andersen, J. 1984. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10(3-4): 203-209.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259): 680-685.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R. et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- Laxman, S. and Beavo, J.A. 2007. Cyclic nucleotide signaling mechanisms in trypanosomes: possible targets for therapeutic agents. *Mol Interv* 7(4): 203-215.
- Letunic, I., Copley, R.R., Schmidt, S., Ciccarelli, F.D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C.P., and Bork, P. 2004. SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res* 32 Database issue: D142-144.
- Liang, X.H., Haritan, A., Uziel, S., and Michaeli, S. 2003. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell* 2(5): 830-840.
- Liniger, M., Acosta-Serrano, A., Van Den Abbeele, J., Kunz Renggli, C., Brun, R., Englund, P.T., and Roditi, I. 2003. Cleavage of trypanosome surface glycoproteins by alkaline trypsin-like enzyme(s) in the midgut of *Glossina morsitans*. *Int J Parasitol* 33(12): 1319-1328.
- Liniger, M., Bodenmüller, K., Pays, E., Gallati, S., and Roditi, I. 2001. Overlapping sense and antisense transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* 40(4): 869-878.

- Liniger, M., Urwyler, S., Studer, E., Oberle, M., Renggli, C.K., and Roditi, I. 2004. Role of the N-terminal domains of EP and GPEET procyclins in membrane targeting and the establishment of midgut infections by *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 137(2): 247-251.
- Liu, M.K. and Pearson, T.W. 1987. Detection of circulating trypanosomal antigens by double antibody ELISA using antibodies to procyclic trypanosomes. *Parasitology* 95 ( Pt 2): 277-290.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods* 25(4): 402-408.
- Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H.O., Bishop, J.R., Falcone, F.H., Gavrilescu, C., Montgomery, J.L., Santori, M.I. et al. 2000. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA* 6(2): 163-169.
- Manival, X., Ghisolfi-Nieto, L., Joseph, G., Bouvet, P., and Erard, M. 2001. RNA-binding strategies common to cold-shock domain- and RNA recognition motif-containing proteins. *Nucleic Acids Res* 29(11): 2223-2233.
- Martinez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., and Myler, P.J. 2003. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* 11(5): 1291-1299.
- Matthews, K.R., Ellis, J.R., and Paterou, A. 2004. Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. *Trends Parasitol* 20(1): 40-47.
- Matthews, K.R. and Gull, K. 1994. Evidence for an interplay between cell cycle progression and the initiation of differentiation between life cycle forms of African trypanosomes. *J Cell Biol* 125(5): 1147-1156.
- Mayho, M., Fenn, K., Craddy, P., Crosthwaite, S., and Matthews, K. 2006. Post-transcriptional control of nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in *Trypanosoma brucei*: evidence for genome-wide conservation of life-cycle stage-specific regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 34(18): 5312-5324.
- Mazumder, B., Seshadri, V., and Fox, P.L. 2003. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* 28(2): 91-98.
- McKean, P.G. 2003. Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Curr Opin Microbiol* 6(6): 600-607.
- McMaster, G.K. and Carmichael, G.G. 1977. Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(11): 4835-4838.
- Mehlert, A., Treumann, A., and Ferguson, M.A. 1999. *Trypanosoma brucei* GPEET-PARP is phosphorylated on six out of seven threonine residues. *Mol Biochem Parasitol* 98(2): 291-296.
- Mehlert, A., Zitzmann, N., Richardson, J.M., Treumann, A., and Ferguson, M.A. 1998. The glycosylation of the variant surface glycoproteins and procyclic acidic repetitive proteins of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 91(1): 145-152.
- Milne, K.G., Prescott, A.R., and Ferguson, M.A. 1998. Transformation of monomorphic *Trypanosoma brucei* bloodstream form trypomastigotes into procyclic forms at 37 degrees C by removing glucose from the culture medium. *Mol Biochem Parasitol* 94(1): 99-112.

- Minning, T.A., Bua, J., Garcia, G.A., McGraw, R.A., and Tarleton, R.L. 2003. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 131(1): 55-64.
- Morking, P.A., Dallagiovanna, B.M., Foti, L., Garat, B., Picchi, G.F., Umaki, A.C., Probst, C.M., Krieger, M.A., Goldenberg, S., and Fragoso, S.P. 2004. TcZFP1: a CCH zinc finger protein of *Trypanosoma cruzi* that binds poly-C oligoribonucleotides in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 319(1): 169-177.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Nagamune, K., Nozaki, T., Maeda, Y., Ohishi, K., Fukuma, T., Hara, T., Schwarz, R.T., Sutterlin, C., Brun, R., Riezman, H. et al. 2000. Critical roles of glycosylphosphatidylinositol for *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(19): 10336-10341.
- Nakaminami, K., Karlson, D.T., and Imai, R. 2006. Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(26): 10122-10127.
- Narberhaus, F., Waldminghaus, T., and Chowdhury, S. 2006. RNA thermometers. *FEMS Microbiol Rev* 30(1): 3-16.
- Navarro, M. and Cross, G.A. 1998. In situ analysis of a variant surface glycoprotein expression-site promoter region in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 94(1): 53-66.
- Nelson, R.G., Parsons, M., Barr, P.J., Stuart, K., Selkirk, M., and Agabian, N. 1983. Sequences homologous to the variant antigen mRNA spliced leader are located in tandem repeats and variable orphans in *Trypanosoma brucei*. *Cell* 34(N3): 901-909.
- Nett, I.R., Martin, D.M., Miranda-Saavedra, D., Lamont, D., Barber, J.D., Mehlert, A., and Ferguson, M.A. 2009. The phosphoproteome of bloodstream form *trypanosoma brucei*, causative agent of African sleeping sickness. *Mol Cell Proteomics* 8(7): 1527-1538.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E. 1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(25): 14687-14692.
- Nolan, D.P., Rolin, S., Rodriguez, J.R., Van Den Abbeele, J., and Pays, E. 2000. Slender and stumpy bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* display a differential response to extracellular acidic and proteolytic stress. *Eur J Biochem* 267(1): 18-27.
- Ouakad, M., Bahi-Jaber, N., Chenik, M., Dellagi, K., and Louzir, H. 2007. Selection of endogenous reference genes for gene expression analysis in *Leishmania major* developmental stages. *Parasitol Res* 101(2): 473-477.
- Overath, P. and Engstler, M. 2004. Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. *Mol Microbiol* 53(3): 735-744.
- Paterou, A., Walrad, P., Craddy, P., Fenn, K., and Matthews, K. 2006. Identification and stage-specific association with the translational apparatus of TbZFP3, a CCH protein that promotes trypanosome life-cycle development. *J Biol Chem* 281(51): 39002-39013.
- Pays, E. 2005. Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Parasitol* 21(11): 517-520.

- Pays, E., Hanocq-Quertier, J., Hanocq, F., Van Assel, S., Nolan, D., and Rolin, S. 1993. Abrupt RNA changes precede the first cell division during the differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms into procyclic forms in vitro. *Mol Biochem Parasitol* 61(1): 107-114.
- Pays, E., Vanhamme, L., and Perez-Morga, D. 2004. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Curr Opin Microbiol* 7(4): 369-374.
- Pelletier, M., Miller, M.M., and Read, L.K. 2000. RNA-binding properties of the mitochondrial Y-box protein RBP16. *Nucleic Acids Res* 28(5): 1266-1275.
- Pelletier, M. and Read, L.K. 2003. RBP16 is a multifunctional gene regulatory protein involved in editing and stabilization of specific mitochondrial mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *RNA* 9(4): 457-468.
- Pepperl, J. 2007. Regulation von *in vivo*-Aktivität der PKA-like kinase in *Trypanosoma brucei*. *Diplomarbeit*: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- Queiroz, R., Benz, C., Fellenberg, K., Hoheisel, J.D., and Clayton, C. 2009. Transcriptome analysis of differentiating trypanosomes reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons. *BMC Genomics* 10: 495.
- Quijada, L., Guerra-Giraldez, C., Drozd, M., Hartmann, C., Irmer, H., Ben-Dov, C., Cristodero, M., Ding, M., and Clayton, C. 2002. Expression of the human RNA-binding protein HuR in *Trypanosoma brucei* increases the abundance of mRNAs containing AU-rich regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 30(20): 4414-4424.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H., and Moorman, A.F. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339(1): 62-66.
- Rascon, A., Soderling, S.H., Schaefer, J.B., and Beavo, J.A. 2002. Cloning and characterization of a cAMP-specific phosphodiesterase (TbPDE2B) from *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(7): 4714-4719.
- Remans, T., Smeets, K., Opdenakker, K., Mathijssen, D., Vangronsveld, J., and Cuypers, A. 2008. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta* 227(6): 1343-1349.
- Reuner, B., Vassella, E., Yutzy, B., and Boshart, M. 1997. Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture. *Mol Biochem Parasitol* 90(1): 269-280.
- Roditi, I. and Clayton, C. 1999. An unambiguous nomenclature for the major surface glycoproteins of the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 103(1): 99-100.
- Roditi, I., Furger, A., Ruepp, S., Schurch, N., and Butikofer, P. 1998. Unravelling the procyclin coat of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 91(1): 117-130.
- Rodriguez-Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burger, G., Roger, A.J., Gray, M.W., Philippe, H., and Lang, B.F. 2007. Toward resolving the eukaryotic tree: the phylogenetic positions of jakobids and cercozoans. *Curr Biol* 17(16): 1420-1425.

- Rolin, S., Hancocq-Quertier, J., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D.P., and Pays, E. 1998. Mild acid stress as a differentiation trigger in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 93(2): 251-262.
- Rolin, S., Paindavoine, P., Hanocq-Quertier, J., Hanocq, F., Claes, Y., Le Ray, D., Overath, P., and Pays, E. 1993. Transient adenylate cyclase activation accompanies differentiation of *Trypanosoma brucei* from bloodstream to procyclic forms. *Mol Biochem Parasitol* 61(1): 115-125.
- Ruepp, S., Furger, A., Kurath, U., Renggli, C.K., Hemphill, A., Brun, R., and Roditi, I. 1997. Survival of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly is enhanced by the expression of specific forms of procyclin. *J Cell Biol* 137(6): 1369-1379.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J., and Moorman, A.F. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37(6): e45.
- Sahara, T., Goda, T., and Ohgiya, S. 2002. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J Biol Chem* 277(51): 50015-50021.
- Sbicego, S., Vassella, E., Kurath, U., Blum, B., and Roditi, I. 1999. The use of transgenic *Trypanosoma brucei* to identify compounds inducing the differentiation of bloodstream forms to procyclic forms. *Mol Biochem Parasitol* 104(2): 311-322.
- Schlaeppli, A.C., Malherbe, T., and Butikofer, P. 2003. Coordinate expression of GPEET procyclin and its membrane-associated kinase in *Trypanosoma brucei* procyclic forms. *J Biol Chem* 278(50): 49980-49987.
- Schulte zu Sodingen, C. 2000. Molekulargenetische Untersuchungen zur Differenzierung von *Trypanosoma brucei*. *Dissertation*: Universität Konstanz.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C.P. 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(11): 5857-5864.
- Schurch, N., Furger, A., Kurath, U., and Roditi, I. 1997. Contributions of the procyclin 3' untranslated region and coding region to the regulation of expression in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 89(1): 109-121.
- Schurch, N., Hehl, A., Vassella, E., Braun, R., and Roditi, I. 1994. Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Mol Cell Biol* 14(6): 3668-3675.
- Shalaby, T., Liniger, M., and Seebeck, T. 2001. The regulatory subunit of a cGMP-regulated protein kinase A of *Trypanosoma brucei*. *European Journal of Biochemistry* 268(23): 6197-6206.
- Shi, H., Djikeng, A., Tschudi, C., and Ullu, E. 2004. Argonaute protein in the early divergent eukaryote *Trypanosoma brucei*: control of small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance. *Mol Cell Biol* 24(1): 420-427.
- Simarro, P.P., Jannin, J., and Cattand, P. 2008. Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? *PLoS Med* 5(2): e55.
- Simpson, L., Sbicego, S., and Aphasizhev, R. 2003. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a complex business. *RNA* 9(3): 265-276.

- Sogin, M.L., Gunderson, J.H., Elwood, H.J., Alonso, R.A., and Peattie, D.A. 1989. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* 243(4887): 75-77.
- Solanas, M., Moral, R., and Escrich, E. 2001. Unsuitability of using ribosomal RNA as loading control for Northern blot analyses related to the imbalance between messenger and ribosomal RNA content in rat mammary tumors. *Anal Biochem* 288(1): 99-102.
- Sonenberg, N. and Hinnebusch, A.G. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136(4): 731-745.
- Steinberg, T.H., Agnew, B.J., Gee, K.R., Leung, W.Y., Goodman, T., Schulenberg, B., Hendrickson, J., Beechem, J.M., Haugland, R.P., and Patton, W.F. 2003. Global quantitative phosphoprotein analysis using Multiplexed Proteomics technology. *Proteomics* 3(7): 1128-1144.
- Suzuki, T., Higgins, P.J., and Crawford, D.R. 2000. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 29(2): 332-337.
- Szoor, B., Wilson, J., McElhinney, H., Taberner, L., and Matthews, K.R. 2006. Protein tyrosine phosphatase TbPTP1: A molecular switch controlling life cycle differentiation in trypanosomes. *J Cell Biol* 175(2): 293-303.
- Tan, K.S., Leal, S.T., and Cross, G.A. 2002. *Trypanosoma brucei* MRE11 is non-essential but influences growth, homologous recombination and DNA double-strand break repair. *Mol Biochem Parasitol* 125(1-2): 11-21.
- Teste, M.A., Duquenne, M., Francois, J.M., and Parrou, J.L. 2009. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol Biol* 10: 99.
- Tetley, L., Turner, C.M., Barry, J.D., Crowe, J.S., and Vickerman, K. 1987. Onset of expression of the variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly studied using immunoelectron microscopy. *J Cell Sci* 87 ( Pt 2): 363-372.
- Ullu, E., Tschudi, C., and Chakraborty, T. 2004. RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol* 6(6): 509-519.
- Urwyler, S., Studer, E., Renggli, C.K., and Roditi, I. 2007. A family of stage-specific alanine-rich proteins on the surface of epimastigote forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* 63(1): 218-228.
- Urwyler, S., Vassella, E., Van Den Abbeele, J., Renggli, C.K., Blundell, P., Barry, J.D., and Roditi, I. 2005. Expression of procyclin mRNAs during cyclical transmission of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog* 1(3): e22.
- van Deursen, F.J., Thornton, D.J., and Matthews, K.R. 2003. A reproducible protocol for analysis of the proteome of *Trypanosoma brucei* by 2-dimensional gel electrophoresis. *Mol Biochem Parasitol* 128(1): 107-110.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034.

- Vanhamme, L., Berberof, M., Le Ray, D., and Pays, E. 1995. Stimuli of differentiation regulate RNA elongation in the transcription units for the major stage-specific antigens of *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 23(11): 1862-1869.
- Vanhamme, L. and Pays, E. 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev* 59(2): 223-240.
- Vassella, E., Acosta-Serrano, A., Studer, E., Lee, S.H., Englund, P.T., and Roditi, I. 2001. Multiple procyclin isoforms are expressed differentially during the development of insect forms of *Trypanosoma brucei*. *J Mol Biol* 312(4): 597-607.
- Vassella, E. and Boshart, M. 1996. High molecular mass agarose matrix supports growth of bloodstream forms of pleomorphic *Trypanosoma brucei* strains in axenic culture. *Mol Biochem Parasitol* 82(1): 91-105.
- Vassella, E., Braun, R., and Roditi, I. 1994. Control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in a procyclin expression site: a dual role for polypyrimidine tracts in trypanosomes? *Nucleic Acids Res* 22(8): 1359-1364.
- Vassella, E., Butikofer, P., Engstler, M., Jelk, J., and Roditi, I. 2003. Procyclin null mutants of *Trypanosoma brucei* express free glycosylphosphatidylinositols on their surface. *Mol Biol Cell* 14(4): 1308-1318.
- Vassella, E., Den Abbeele, J.V., Butikofer, P., Renggli, C.K., Furger, A., Brun, R., and Roditi, I. 2000. A major surface glycoprotein of *trypanosoma brucei* is expressed transiently during development and can be regulated post-transcriptionally by glycerol or hypoxia. *Genes Dev* 14(5): 615-626.
- Vassella, E., Oberle, M., Urwyler, S., Renggli, C.K., Studer, E., Hemphill, A., Fragoso, C., Butikofer, P., Brun, R., and Roditi, I. 2009. Major surface glycoproteins of insect forms of *Trypanosoma brucei* are not essential for cyclical transmission by tsetse. *PLoS ONE* 4(2): e4493.
- Vassella, E., Probst, M., Schneider, A., Studer, E., Renggli, C.K., and Roditi, I. 2004. Expression of a major surface protein of *Trypanosoma brucei* insect forms is controlled by the activity of mitochondrial enzymes. *Mol Biol Cell* 15(9): 3986-3993.
- Vassella, E., Reuner, B., Yutzy, B., and Boshart, M. 1997. Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *J Cell Sci* 110: 2661-2671.
- Vertommen, D., Van Roy, J., Szikora, J.P., Rider, M.H., Michels, P.A., and Opperdoes, F.R. 2008. Differential expression of glycosomal and mitochondrial proteins in the two major life-cycle stages of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 158(2): 189-201.
- Vickerman, K. 1985. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br Med Bull* 41(2): 105-114.
- Vickerman, K., Tetley, L., Hendry, K.A.K., and Turner, C.M.R. 1988. Biology of African trypanosomes in the tsetse fly. *Biology of the Cell* 64(N2): 109-119.
- Walrad, P., Paterou, A., Acosta-Serrano, A., and Matthews, K.R. 2009. Differential Trypanosome Surface Coat Regulation by a CCCH Protein That Co-Associates with procyclin mRNA cis-Elements. *PLoS Pathog* 5(2): e1000317.



- Walter, A.E., Turner, D.H., Kim, J., Lyttle, M.H., Muller, P., Mathews, D.H., and Zuker, M. 1994. Coaxial stacking of helices enhances binding of oligoribonucleotides and improves predictions of RNA folding. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(20): 9218-9222.
- WHO. 2006. Human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Weekly Epidemiological Record* 81: 71-80.
- Wiesmann, C., Barr, K.J., Kung, J., Zhu, J., Erlanson, D.A., Shen, W., Fahr, B.J., Zhong, M., Taylor, L., Randal, M. et al. 2004. Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *Nat Struct Mol Biol* 11(8): 730-737.
- Wilkinson, S.R. and Kelly, J.M. 2009. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev Mol Med* 11: e31.
- Wilson, K., Uyetake, L., and Boothroyd, J. 1999. *Trypanosoma brucei*: cis-acting sequences involved in the developmental regulation of PARP expression. *Exp Parasitol* 91(3): 222-230.
- Wirtz, E. and Clayton, C. 1995. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science* 268(5214): 1179-1183.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., and Cross, G.A. 1999. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 99(1): 89-101.
- Wistow, G. 1990. Cold shock and DNA binding. *Nature* 344(6269): 823-824.
- Ziegelbauer, K., Quinten, M., Schwarz, H., Pearson, T.W., and Overath, P. 1990. Synchronous differentiation of *Trypanosoma brucei* from bloodstream to procyclic forms in vitro. *European Journal of Biochemistry* 192(N2): 373-378.
- Zoraghi, R., Kunz, S., Gong, K., and Seebeck, T. 2001. Characterization of TbPDE2A, a novel cyclic nucleotide-specific phosphodiesterase from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 276(15): 11559-11566.
- Zoraghi, R. and Seebeck, T. 2002. The cAMP-specific phosphodiesterase TbPDE2C is an essential enzyme in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(7): 4343-4348.
- Zuker, M. 2000. Calculating nucleic acid secondary structure. *Curr Opin Struct Biol* 10(3): 303-310.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31(13): 3406-3415.
- Zuker, M. and Jacobson, A.B. 1998. Using reliability information to annotate RNA secondary structures. *RNA* 4(6): 669-679.



## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

$\Delta$	Deletion/Deletionsmutante
$\Delta G$	freie Energie
AGO1	Agronaute1
Amp	Ampicillin
BARP	<i>Brucei</i> Alanin-reiches Protein (früher: Blutstrom Alanin-reiches Protein)
BLE	Bleomycin Resistenz Protein
BSA	Bovines Serum Albumin
BSF	Blutstromform von <i>T. brucei</i>
CA	Korrespondenzanalyse
cAMP	zyklisches Adenosin Monophosphat
CAP	Cytoskelett-assoziiertes Protein
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
cpm	„counts per minute“
CoA	Coenzym A
COX	Cytochrom Oxidase
CSD	Interpro „Cold Shock Domain“
Ct	Schwellenwert Zyklus „threshold cycle“
Cy	Cyanin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DOC	Natriumdeoxycholat
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
EP	Prozyklin mit repetitiver E-P Aminosäuresequenz
ER	endoplasmatisches Retikulum
ES	Expressionsstelle (des VSG-Gens)
ESAG	„expression site associated gene“
EST	„expressed sequence tag“
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	fötales Rinder Serum
GARP	Glutaminsäure Alanin-reiches Protein
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPEET	Prozyklin mit repetitiver G-P-E-E-T Aminosäuresequenz
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRE	„glycerol responsive element“
GRESAG	„gene related to ESAG“
GSS	„genome survey sequence“
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
G418	Geneticin
HMM	„hidden Markov model“
HYG	Hygromycin Phosphotransferase
IGR	Intergenregion
inv	Inversionsmutante
IP	Immunpräzipitation
IPG	immobilisierter pH Gradient
iTRAQ	„isobaric tag for relative and absolute quantification“

LB	Luria-Bertani-Nährmedium
LUC	Luciferase
LUC+	Luciferase+
M	Stabilität der Genexpression (geNorm)
M-CHiPS	„multi-conditional hybridization intensity processing system“
MW	Molekulargewicht
NEO	Neomycin Phosphotransferase
NL	IPG Streifen mit nicht linearem pH Gradienten
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAC	Puromycin N-acetyl Transferase
PAG	Prozyklin assoziiertes Gen
PAGE	Polyacrylamidgel Elektrophorese
PARP	„procyclic acidic repetitive protein“ (veraltete Bezeichnung der Prozykline)
PCF	prozyklische Form von <i>T. brucei</i>
PDE	Phosphodiesterase
PEI	Polyethylenimin
pI	isoelektrischer Punkt
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PKA	Proteinkinase A
Pol	Polymerase
PPDK	Pyruvat Phosphat Dikinase
r	Spearman Rangkorrelationskoeffizient
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“
RBP	RNA-bindendes Protein
RLU	relative Lichteinheiten
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RTase	reverse Transkriptase
SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
SIF	stumpy Induktions-Faktor
SL	„spliced leader“
SOB	„super optimal broth“ -Nährmedium
ss	einzelsträngig
TCA	Trichloressigsäure
TDB	„Trypanosoma dilution buffer“
Tet	Tetrazyklin
TetR	Tetrazyklin Repressor
Tris	Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
ÜN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
V	paarweise Variation (geNorm)
VASP	„vasidolator-stimulated phosphoprotein“
VBA	„visual basic for applications“
VE H <sub>2</sub> O	vollentsalztes Wasser
Vh	Voltstunden
VSG	Variables Oberflächen-Glykoprotein
WHO	Weltgesundheitsorganisation
w/v	„weight/volume“
w/w	„weight/weight“
ZFP	Zinkfinger Protein

## 6.2 mRNA- und Protein Daten

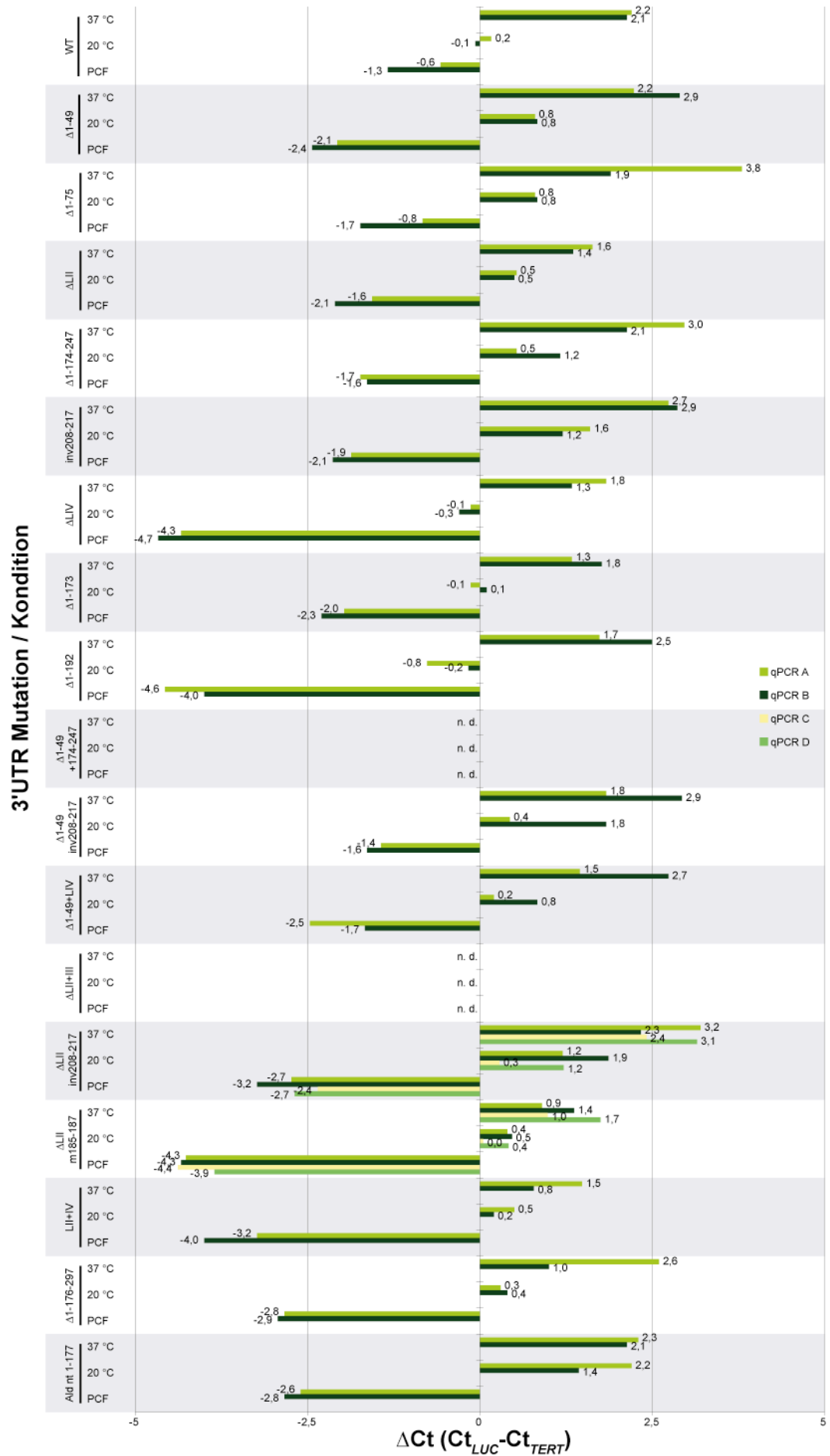
A Zusammenfassung der RNA Daten					
Mutation in Loop	Zelllinie	37 °C	20 °C	PCF	
WT	WT	1,00	4,09	10,28	10
I	Δ1-49	0,77	2,46	18,93	25
I	Δ1-75	0,63	2,46	9,94	16
II+III	ΔLII	1,57	3,00	14,34	9
III	Δ174-247	0,77	2,40	12,98	17
III	inv208-217	0,66	1,67	16,02	24
IV	ΔLIV	1,47	4,89	84,65	57
I+II	Δ1-173	1,51	4,28	17,51	12
I+II	Δ1-192	1,03	5,77	73,28	71
I+III	Δ1-49+174-247	n. d.	n. d.	n. d.	
I+III	Δ1-49 inv208-217	0,87	1,99	11,74	14
I+IV	Δ1-49+LIV	1,05	3,00	16,75	16
II+III	ΔLII+III	n. d.	n. d.	n. d.	
II+III	ΔLII inv208-217	0,67	1,98	26,40	40
II+III	ΔLII m185-187	1,84	3,39	69,72	38
II+IV	ΔLII+IV	1,99	3,35	47,01	24
III+IV	Δ176-297	1,28	3,35	28,85	23
Aldolase	Ald nt 1-177	0,97	1,26	25,82	27

B Zusammenfassung der Protein Daten					
Mutation in Loop	Zelllinie	37 °C	20 °C	PCF	
WT	WT	1,0	85,0	3045,2	3045
I	Δ1-49	0,3	23,9	2567,8	7800
I	Δ1-75	0,4	34,4	904,4	2051
II+III	ΔLII	29,2	1013,4	6308,5	216
III	Δ174-247	0,6	66,5	2571,4	4222
III	inv208-217	0,3	13,2	1585,3	5809
IV	ΔLIV	8,9	476,8	7011,6	789
I+II	Δ1-173	9,3	297,8	5400,5	582
I+II	Δ1-192	19,3	669,0	9146,6	475
I+III	Δ1-49+174-247	0,5	24,4	193,5	429
I+III	Δ1-49 inv208-217	0,2	17,4	69,6	295
I+IV	Δ1-49+LIV	1,5	192,4	1761,1	1140
II+III	ΔLII+III	21,3	525,4	3243,7	152
II+III	ΔLII inv208-217	21,5	274,1	6507,5	303
II+III	ΔLII m185-187	25,5	573,9	11036,4	433
II+IV	ΔLII+IV	77,7	786,8	9399,9	121
III+IV	Δ176-297	12,6	512,7	4501,0	356
Aldolase	Ald nt 1-177	22,0	231,4	4221,3	192

Zusammenfassende Darstellung der relativen mRNA-Expressionen (A) und Luciferaseaktivitäten (B) normiert auf die jeweiligen Werte des WT bei 37 °C (schwarze Zahlen). Die Induktionen nach Kälteschock oder Entwicklung zu PCF sind hellgrün (Faktor 37 °C/20 °C) bzw. dunkelgrün (Faktor PCF/37 °C) angegeben. Die Veränderungen der Expressionen durch die jeweiligen Mutationen im Vergleich zum WT derselben Kondition sind rot (37 °C), türkis (20 °C) bzw. orange (PCF) hervorgehoben.

## 6.3 Replikatmessungen der mRNA-Expressionen



## 6.4 Parameter für die Berechnung von 3'UTR-Sekundärstrukturen

3'UTR Mutation	WT (Drozd und Clayton 1999) inv 208-217	$\Delta$ LII $\Delta$ LII m 185-187  $\Delta$ LII 16mer Inversionen	$\Delta$ 1-49 $\Delta$ 1-49 inv 208-217	$\Delta$ 1-75	$\Delta$ 1-173	$\Delta$ 1-192	$\Delta$ 174-247
Parameter	P 50 0 2 P 64 0 3 P 99 0 4 P 109 0 3 P 120 0 4 P 148 0 2 P 173 0 5 P 195 0 1 (*) P 211 0 6	P 50 0 2 P 64 0 3 P 99 0 2 P 106 0 4 P 127 0 1 (*) P 143 0 6	P 1 0 2 P 15 0 3 P 50 0 4 P 60 0 3 P 71 0 4 P 99 0 2 P 124 0 5 P 146 0 1 (*) P 162 0 6	P 24 0 4 P 34 0 3 P 45 0 4 P 73 0 2 P 98 0 5 P 120 0 1 P 136 0 6	P 1 0 4 P 22 0 1 P 38 0 6	P 3 0 1 P 19 0 6	P 50 0 2 P 64 0 3 P 99 0 4 P 109 0 3 P 120 0 4 P 148 0 2 P 173 0 1

3'UTR Mutation	$\Delta$ 1-49+174-247	$\Delta$ 1-49+LIV	$\Delta$ 176-297	$\Delta$ LIV	$\Delta$ LII+III	$\Delta$ LII+IV $\Delta$ LII+IV+ IGRA1-274
Parameter	P 1 0 2 P 15 0 3 P 50 0 4 P 60 0 3 P 71 0 4 P 99 0 2 P 124 0 1	P 1 0 2 P 15 0 3 P 50 0 4 P 60 0 3 P 71 0 4 P 99 0 2 P 124 0 5 P 146 0 1 P 162 0 6	P 50 0 2 P 64 0 3 P 99 0 4 P 109 0 3 P 120 0 4 P 148 0 2 P 173 0 3	P 50 0 2 P 64 0 3 P 99 0 4 P 109 0 3 P 120 0 4 P 148 0 2 P 173 0 5 P 195 0 1 P 211 0 6	P 50 0 2 P 64 0 3 P 99 0 2	P 50 0 2 P 64 0 3 P 99 0 2 P 106 0 4 P 127 0 1 P 143 0 6

Bei der Berechnung von 16mer Mutationen (markiert mit \*) wurden vergleichsweise sowohl die Parameter mit- und ohne Einschränkungen für das 16mer verwendet.

## 6.5 Formeln für statistische Berechnungen

Erwartungswert ( $E$ ) und Standardfehler ( $SF$ ) der Induktionsfaktoren nach Kälteschock ( $\text{Expression}_{20^\circ\text{C}}/\text{Expression}_{37^\circ\text{C}}$ ) bzw. Stadienregulation ( $\text{Expression}_{\text{PCF}}/\text{Expression}_{\text{BSF}}$ ) aller 3'UTR-Mutanten [siehe Abb. 23 (B)] wurden mit der „propagation of error“ Methode berechnet (siehe Rice 2006). Die verwendeten Formeln sind hier angegeben, wobei:

$\mu_x$  = Mittelwert der Luciferaseaktivität (RLU/10 s) von BSF (37 °C)

$\mu_y$  = Mittelwert der Luciferaseaktivität (RLU/10 s) von BSF (20 °C) bzw. PCF (27 °C)

$$\bar{\sigma}_x = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$E(Z) \approx \frac{\mu_y}{\mu_x} + \sigma_{\bar{x}}^2 \frac{\mu_y}{\mu_x^3}$$

$$\text{Var}(Z) \approx \sigma_{\bar{x}}^2 \frac{\mu_y^2}{\mu_x^4} + \frac{\sigma_{\bar{y}}^2}{\mu_x^2}$$

$$SF = \sqrt{\text{Var}(Z)}$$

## 6.6 Zusammensetzung phosphatfreies HMI9

Substanz	Chem. Formel	Molarität (mM)	MW (g/mol)	mg für 5 L Medium
Glyzin	$C_2H_5NO_2$	0,400	75,07	150,140
L-Alanin	$C_3H_7NO_2$	0,281	89,09	125,171
L-Arginin	$C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl$	0,398	210,70	419,293
L-Asparagin	$C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$	0,167	150,10	125,367
L-Aspartat	$C_4H_7NO_4$	0,226	133,10	150,403
L-Cystin	$C_6H_{12}N_2O_4S_2 \cdot 2HCl$	0,381	313,22	596,684
L-Glutamat	$C_5H_9NO_4 \cdot HCl$	0,510	183,60	468,180
L-Glutamin	$C_5H_{10}N_2O_3$	4,000	146,15	2923,000
L-Histidin	$C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$	0,200	209,60	209,600
L-Isoleucin	$C_6H_{13}NO_2$	0,802	131,20	526,112
L-Leucin	$C_6H_{13}NO_2$	0,802	131,20	526,112
L-Lysin	$C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$	0,798	182,60	728,574
L-Methionin	$C_5H_{11}NO_2S$	0,201	149,20	149,946
L-Phenylalanin	$C_9H_{11}NO_2$	0,400	165,20	330,400
L-Prolin	$C_5H_9NO_2$	0,348	115,10	200,274
L-Serin	$C_3H_7NO_3$	0,400	105,10	210,200
L-Threonin	$C_4H_9NO_3$	0,798	119,10	475,209
L-Tryptophan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	0,0784	204,20	80,046
L-Tyrosin	$C_9H_{11}NO_3$	0,462	181,19	418,549
L-Valine	$C_5H_{11}NO_2$	0,803	117,10	470,157
Biotin	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	0,0000533	244,31	0,065
Calcium Chlorid	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,490	147,00	1095,299
Magnesiumsulfat	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,814	246,48	1003,174
Kaliumchlorid	KCl	4,400	74,56	1640,320
Kaliumnitrat	$KNO_3$	0,000752	101,10	0,380
Natrium Chlorid	NaCl	77,59	58,44	20971,798
Natrium Selenit	$Na_2SeO_3$	0,0000658	172,90	0,057
D-Glucose	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	25,00	198,17	24771,250
HEPES	$C_8H_{18}N_2O_4S$	25,03	238,31	29824,497
Phenolrot	$C_{19}H_{13}O_5SNa$	0,0399	376,40	75,092
Natriumpyruvat	$C_3H_3NaO_3$	1	110,04	550,200
Natrium-Bicarbonat	$NaHCO_3$	36	84,01	15120,000

Flüssigkeiten	ml für 5 L Medium
Invitrogen MEM Vitamin Solution (Cat. No 11120052)	200
ddH <sub>2</sub> O	ad 4000

Komplementation wie Standard HMI9, jedoch mit dialysiertem FBS (PAA)

Im Gegensatz zum Standard HMI9 fehlen:

Substanz	Chem. Formel	Molarität (mM)	MW (g/mol)	mg für 5 L Medium
Vitamin B12	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}$ <sup>P</sup>	0,0000096	1355	0,065
Sodium Phosphate monobasic	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0,906	138	625,095



## Publikationen

Brenndörfer, Martin und Boshart, Michael 2010. Selection of reference genes for mRNA quantification in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 172(1): 52-55

Brenndörfer, Martin und Boshart, Michael. Posttranscriptional Regulation by Cold Shock of the *Trypanosoma brucei* Major Surface Protein Procyclin: Manuskript in Vorbereitung

## Konferenzen, Fortbildungen und Auslandsaufenthalte

- |               |  |
|---------------|--|
| Juli 2004     | University of Cambridge, UK<br>Department of Biochemistry, Labor von Dr. Mark Carrington<br>Vertikale Glyoxalgelelektrophorese von RNA und Northern Blot                                 |
| Mai 2005      | DKFZ Heidelberg<br>Abteilung funktionelle Genomanalyse, Dr. Jörg Hoheisel<br>Bioinformatische Analyse von Microarraydaten mit M-CHiPS  |
| März 2006     | ZMBH Heidelberg<br>Symposium: mRNA Regulation in Trypanosomes (Vortrag)  |
| April 2007    | Woods Hole, USA<br>2nd Kinetoplastid Molecular Cell Biology Conference (Poster)  |
| November 2007 | GDCh Fortbildungskurs an der Technischen Universität München, Freising<br>Fachgebiet Proteomik, Prof. Dr. Dr. Angelika Görg<br>Zweidimensionale Gelelektrophorese für die Proteomanalyse |
| August 2008   | EMBL Heidelberg<br>Proteomic Core Facility, Dr. Thomas Franz<br>Course on Protein Separation by 2D Gel Electrophoresis   |

## Lehrerfahrung

- |           |  |
|-----------|--|
| 2004-2007 | Organisation der „Joint Genetics and Microbiology Progress“ Seminare                 |
| 2004-2008 | Betreuung von fünf Genetik Fortgeschrittenenpraktika                                 |
| 2005-2008 | Betreuung von drei Forschungspraktika für Studenten mit Hauptfach Genetik            |
| 2006      | Organisation und Betreuung des Kursmoduls Methoden für RNA-Analyse                   |
| 2008      | Organisation und Betreuung des Kursmoduls Methoden zur Analyse von Signalübertragung |
| 2009      | Betreuung des Praktikums Genetik 2 für Bachelorstudierende                           |

## 6.7 Elektronischer Anhang auf beiliegender DVD

- Microarraydaten
- Daten der Mutationsanalyse
- Sekundärstrukturberechnungen
- Phosphoproteomics Originaldaten
- Datenblätter der verwendeten Antikörper und Inhibitoren
- Dissertation als PDF-Datei und Abbildungen im Originalformat
- Paper 1 (Reference genes for qPCR)
- Sequenzen
- Software
- Verwendete Literatur
- Zellkultur



## Danksagung

### Ich möchte mich bedanken bei ...

... Michael Boshart für die Möglichkeit, dieses interessante Forschungsthema in seiner Gruppe zu bearbeiten, die wissenschaftlichen Diskussionen, die Förderung meiner Teilnahme an mehreren Kursen und Konferenzen und für seine Unterstützung auch in schwierigen Zeiten.

... Martin Parniske für die Erstellung des Zweitgutachtens, sowie für die Bereitstellung von Geräten und Software für die 2D Gelelektrophorese bzw. deren Auswertung.

... Markus Engstler für die Betreuung zu Beginn meiner Doktorarbeit.

... Stefanie Brems, Christine Clayton und Jörg Hoheisel für die Microarray Kooperation

... Markus Kador für seine außergewöhnliche Hilfsbereitschaft nicht nur bei RNAi Konstrukten und HMMER-Profilsuchen.

... George Githure für die Unterstützung bei Protein-Experimenten und unzählige interessante Diskussionen.

... den Großpraktikanten Julia Pepperl, Marc Panzer und Bastian Mühl, die mit ihrem Engagement zum Gelingen dieses Projektes beitrugen.

...allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Boshart, die immer hilfsbereit waren und ihren Teil zur angenehmen Arbeitsatmosphäre im Labor beitrugen.

### Des Weiteren danke ich:

Beate Fast für die MITat1.4 pHD449 Zelllinie,  
 Keith Matthews für den anti-*TbZFP3* Antikörper,  
 Christian Janzen für die MITat 1.2  $\Delta ago1/\Delta ago1$  Zelllinie,  
 Mark Carrington für seine Gastfreundschaft in Cambridge,  
 Dirk Metzler für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung,  
 Bio-Rad für die Einladung zum 2DGE Kurs im EMBL Heidelberg,  
 Susanne Diehl für die Auswertung des Microarray-Vorversuches,  
 Andreas Brachmann für seine Unterstützung bei radioaktiven Arbeiten,  
 Jörg Hoheisel für die Einladung zum M-CHiPS Kurs im DKFZ Heidelberg,  
 Carsten Krumbholz für die MITat 1.2  $\Delta pkar/\Delta pkar$  Zelllinie und vieles mehr,  
 der GDCh für die Förderung meiner Teilnahme am 2DGE Kurs an der TU München,  
 Herrn Fellner und Sigi für ihre fachmännische Hilfe beim (Um-)Bau verschiedener Geräte,  
 der Universitätsgesellschaft für die Förderung meiner Teilnahme am KMCB-Meeting in Woods Hole.

